



Dynamique conformationnelle des protéines étudiée par dichroïsme circulaire résolu en temps

Lucille Mendonca

► To cite this version:

Lucille Mendonca. Dynamique conformationnelle des protéines étudiée par dichroïsme circulaire résolu en temps. Biophysique [physics.bio-ph]. Ecole Polytechnique X, 2013. Français. NNT : . pastel-00843425

HAL Id: pastel-00843425

<https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00843425>

Submitted on 11 Jul 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE

par Lucille Mendonca

DYNAMIQUE CONFORMATIONNELLE DES
PROTÉINES ÉTUDIÉE PAR DICHROÏSME
CIRCULAIRE RÉSOLU EN TEMPS

Soutenue le 5 juillet 2013 devant le jury composé de :

Thomas GUSTAVSSON	Rapporteur
Stefan GUY	Rapporteur
Matthieu REFREGIERS	Président
Jan HELBING	Examineur
François HACHE	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

J'ai effectué mon travail de thèse au Laboratoire d'Optique et Biosciences, et je tiens tout d'abord à remercier Jean-Louis Martin de m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire d'excellence.

J'adresse des remerciements particuliers à François Hache pour avoir dirigé mon travail de thèse avec pédagogie, modestie, gentillesse, enthousiasme, toujours le sourire et surtout beaucoup d'optimisme face aux mesures de dichroïsme circulaire pas toujours faciles à interpréter. J'ai grandement apprécié ma relation de travail avec François : nous nous sommes mutuellement appris beaucoup de choses dans le domaine scientifique.

Merci également à Thomas Gustavsson, Stefan Guy, Matthieu Refregiers et Jan Helbing d'avoir participé à mon jury de thèse. Merci pour les remarques, les questions pertinentes qui nous ont permis de discuter de mon travail au cours de la soutenance.

Je remercie infiniment Pascale Chagnenet-Barret pour son aide sur l'expérience PYP : sans sa connaissance approfondie de cette molécule nous n'aurions pas été capables d'interpréter nos mesures et d'en faire un article intéressant. I thank Martin Volk, with whom I have spent a few weeks in Liverpool working on T-jump experiments and who has come to visit us several times, for sharing with us his knowledge about T-jump experiments and PGA.

Je voudrais remercier aussi Jean-Marc Sintès et Xavier Solinas sans qui les montages expérimentaux ne tiendraient pas debout et provoqueraient sans doute des surtensions. Merci à Jean-Marc pour les porte cuve mobiles et autres pièces mécaniques. Merci à Xavier pour les amplis, contrôleurs et autres boîtes électroniques faites sur mesure, et aussi merci pour l'ambiance, le barbecue et les discussions le midi.

Un merci spécial pour Joëlle Kuhn, Michel Négrerie, Alessio Ligabue et Latifa Bouzhir-Sima pour m'avoir aidé lorsque j'ai dû faire une culture bactérienne et extraire la bacteriorhodopsine par des méthodes peu communes.

Merci à Laure Lachapelle et Christelle Français pour leur soutien administratif et sans qui le laboratoire ne tournerait pas.

Special thanks to Mai-Thu Khuc, who built the first T-jump and CD experiments before I arrived in the lab and gave me an already really stable basis to start my experiments.

I would like to thank Andreas Steinbacher, who came to work with us on the T-jump while we installed a new pump laser. He knew a lot of things about electronic noises and how to avoid them and helped us a lot. And it was a lot of fun chatting and laughing with him at the lab and in bars.

Je voudrais remercier l'équipe du magistère de Physique Fondamentale et du module de Physique 102 de l'université Paris sud, Jérôme Leygnier, Christophe Balland et Marion Jacquety, pour m'avoir accueillie et permis d'enseigner à leur côté avec des étudiants et un contexte de grande qualité.

Merci à tous les doctorants et stagiaires qui ont partagé du temps au LOB avec moi, merci pour l'ambiance, pour les soirées au bar, les discussions et les pauses thé. De même, merci à l'ensemble du LOB pour l'accueil chaleureux de ce laboratoire.

Enfin, merci à ma famille et mes amis. En particulier merci à Bart et Laureline pour le bonheur chaque jour, et pour m'avoir contrainte à rentrer tôt le soir.

Table des matières

I	Le repliement des protéines	11
1	Introduction	13
1.1	La structure des protéines	13
1.2	Le repliement des protéines	15
1.2.1	Le Postulat d'Anfinsen	15
1.2.2	Les modèles de repliement	15
	Le paradoxe de Levinthal	15
	Les modèles de repliement	15
	L'entonnoir de repliement	16
1.2.3	Pathologies	17
1.3	Activité optique des molécules chirales	17
1.3.1	La chiralité	17
1.3.2	L'activité optique	18
	Rappels de polarisation	19
	Le pouvoir rotatoire	19
	Le dichroïsme circulaire	20
	Résumé	21
1.4	Expressions et unités du dichroïsme circulaire	22
1.5	Le dichroïsme circulaire dans les protéines	23
2	Mesures dynamiques dans les protéines	27
2.1	Choix de la méthode	27
2.1.1	Les principales techniques d'observation	27
2.1.2	Initiation de la dynamique moléculaire	29
2.2	Mesure directe du dichroïsme circulaire avec la cellule de Pockels	29
2.2.1	Génération d'onde polarisée circulairement	30
	Les milieux anisotropes	30
	Lame à retard	31
	Lame quart d'onde	31
2.2.2	La cellule de Pockels	32
	L'effet Pockels	32
	Utilisation de la cellule de Pockels	33
2.2.3	Mesure du dichroïsme circulaire	34
2.2.4	Limitations de la méthode	35
2.3	Mesure indirecte du dichroïsme circulaire avec le compensateur de Babinet-Soleil	36

2.3.1	Le compensateur de Babinet Soleil	36
2.3.2	Méthode de mesure du dichroïsme circulaire	37
	Montage	37
	Intensité lumineuse reçue par le détecteur	37
	Mesure du dichroïsme circulaire	40
2.3.3	Limitations de la méthode	42
2.4	Conclusion	43

II Dynamique de dépliement de polypeptides après un saut de température 45

3 Principe et étalonnage de l'expérience 47

3.1	L'expérience pompe-sonde	47
3.1.1	Description de l'expérience	47
3.1.2	Obtention du saut de température	48
	Méthodes	48
	Une pompe dans l'infra-rouge	48
3.1.3	Génération de la sonde UV	49
3.1.4	Taille des faisceaux	50
3.2	Saut de température	52
3.2.1	Simulations mathématiques de la température	53
	Principe du calcul	53
	Résultats de la simulation	54
3.2.2	Mesure expérimentale de la température	56
	Le tampon trishydroxyméthylaminométhane	56
	Le bleu de bromothymol	57
	Etalonnage de l'échantillon	57
	Dynamique du saut de température	59
3.2.3	Le saut de température dans l'eau lourde	62
	Propriétés thermodynamiques	62
	Evaluation du saut de température	63
3.2.4	Conclusion	63

4 Dynamique de dépliement de l'acide polyglutamique PGA 65

4.1	Spectres de CD du PGA	66
4.1.1	Préparation de l'échantillon	66
	Dans l'eau	66
	Dans l'eau lourde	67
4.1.2	Spectres de CD	67
	CD du PGA dans l'eau	67
	CD du PGA dans l'eau lourde	68
4.2	Exploitation thermodynamique des courbes de fusion	68
4.2.1	Méthode	68
	Ajustement des courbes de fusion	68

	Allure des courbes de fusion	69
	Adaptation de la méthode d'exploitation	72
4.2.2	Résultats dans l'eau lourde	72
4.2.3	Résultats dans l'eau	73
4.3	Dépliection du PGA dans l'eau	74
4.3.1	Détails expérimentaux	74
4.3.2	Allure et méthode d'exploitation des courbes	75
	Allure des courbes	75
	Extraction de la constante de temps	77
4.3.3	Résultats expérimentaux	78
	Résultats bruts	78
	Énergie d'activation globale	79
4.4	Dépliection du PGA dans l'eau lourde	79
4.4.1	Les différences et similitudes entre l'eau et l'eau lourde	80
4.4.2	Résultats de l'expérience de T-jump	82
	Résultats bruts	83
	Énergie d'activation globale du PGA dans l'eau lourde	84
4.5	Interprétation	84
4.5.1	Temps de dépliection et de repliection	84
	Propagation des incertitudes	85
	Dans l'eau	85
	Dans l'eau lourde	86
4.5.2	Énergies d'activation	87
	Dans l'eau	87
	Dans l'eau lourde	88
4.5.3	Interprétation	89
4.6	Conclusion de l'étude	91

III Dynamique dans les protéines photosenseurs 93

5 Étapes précoces du photocycle de la PYP 95

5.1	La photoactive yellow protein	95
5.1.1	Description	95
5.1.2	Le photocycle de la PYP	97
5.1.3	L'intermédiaire GSI	98
5.2	Mesure du dichroïsme circulaire résolue en temps	99
5.2.1	L'expérience pompe sonde	100
	Obtention des faisceaux pompe et sonde	100
	Déroulement d'une mesure	101
5.2.2	Nombre de molécules excitées	102
	Nombre de molécules sondées	102
	Nombre de molécules excitées	103
5.3	Résultats de la mesure	104

5.3.1	Pompe sonde simple en absorption	104
5.3.2	Acquisition complète avec le Babinet-Soleil	105
5.3.3	Absorption et CD de l'état excité	106
5.4	Interprétation des résultats	107
5.4.1	Amplitude du saut de CD. Règle de l'octant	107
	La règle de l'octant	107
	Basculement de C=O	108
5.4.2	Calcul des dynamiques d'absorption et de dichroïsme circulaire	110
	Description des états de la protéine	110
	Equations des populations	111
	Expression de l'absorption et du CD	111
5.4.3	Résultats de la simulation et comparaison à l'expérience	112
5.5	Conclusion de l'expérience	114
6	Mouvements des hélices alpha dans la bacteriorhodopsine	117
6.1	Les protéines à rétinol	117
6.1.1	Les protéines membranaires	117
6.1.2	Famille des rhodopsines	118
	Les rhodopsines de la vision	118
	Les rhodopsines archaïques	119
6.2	La bacteriorhodopsine	120
6.2.1	Structure	120
6.2.2	Photocycle	121
	Forme adaptée à la lumière	122
	Détails des étapes	122
	Changements conformationnels	123
6.3	Montage expérimental et résultats	124
6.3.1	Montage	124
6.3.2	Résultats	124
6.4	Interprétation	125
IV	Conclusion	127
V	Annexes	131
	Annexe A : spectrophotomètre à dichroïsme circulaire	133
	Motivations	133
	Principe et mise en oeuvre	133
	Le modulateur photoélastique	134
	Difficultés expérimentales	135
	Spectres obtenus	135
	Spectres du binaphthol	135
	Spectres du PGA	136
	Annexe B : T-jump dans le tampon d'acide acétique	138

Préparation de l'échantillon	138
Spectres de CD en fonction de la température	138
Saut de pH	140
Résultats du T-jump	141
Conclusion	141
Annexe C : extraction de la bacteriorhodopsine	143
Culture de la bactérie	143
Extraction de la membrane pourpre	143
Bibliographie	148

Première partie

Le repliement des protéines

Chapitre 1

Introduction

Les protéines sont parmi les molécules les plus importantes du monde vivant. Ce sont en quelque sorte les abeilles ouvrières de tout organisme. Elles remplissent, entre autres, des fonctions enzymatiques, nerveuses, motrices ; elles transportent les petites molécules qui permettent aux cellules de fonctionner et de s'alimenter.

L'étude des mouvements des protéines a débuté à la fin des années 1970[1]. Jusqu'alors la plupart des scientifiques considéraient les protéines comme des macromolécules à la structure tridimensionnelle fixe et il fallut de nombreuses preuves expérimentales pour convaincre de l'existence de ces mouvements[2]. De nombreuses simulations numériques ont été effectuées pour comprendre les changements de conformation des protéines lors de leur activité dans la cellule ainsi que leur repliement après leur synthèse. Cependant, si de nombreux modèles expliquent comment les protéines se replient et se déforment, le pourquoi du bon repliement d'une protéine n'est pas élucidé. Ce repliement est un processus fondamental au cours duquel l'information génétique est traduite en information tridimensionnelle, condition nécessaire à l'apparition des propriétés fonctionnelles.

L'utilisation du dichroïsme circulaire pour sonder les structures intermédiaires au cours du repliement des protéines a commencé dans les années 1970[3]. De nos jours, cette technique, couplée aux expériences pompe-sonde, permet d'élucider la dynamique des toutes premières étapes du repliement.

Dans cette introduction nous allons d'abord décrire la structure des protéines, et aborder le problème de leur repliement. Dans un second temps j'introduirai la notion de dichroïsme circulaire et son lien avec la structure des protéines.

1.1 La structure des protéines

Les protéines sont des macromolécules constituées de blocs de base : les acides aminés[4]. Toutes les protéines sont synthétisées à l'aide de 20 acides aminés différents. Ces acides aminés ont tous une structure semblable et diffèrent par leur chaîne latérale qui peut être hydrophile, hydrophobe, acide ou basique (figure 1.1). Les acides aminés, aussi appelés résidus, se lient entre eux pour former une protéine grâce à la liaison peptidique.

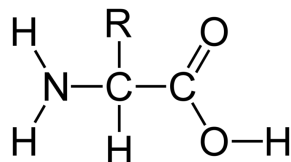


FIGURE 1.1 – Le groupement R représente la chaîne latérale. C'est ce groupement qui diffère d'un acide aminé à un autre

L'ordre d'enchaînement des acides aminés dans une protéine est codé par un gène. C'est la structure primaire de la protéine.

Ensuite la protéine adopte une configuration en 3 dimensions dont on peut distinguer différents niveaux de structure :

- La structure secondaire est constituée des éléments de la protéine présentant un arrangement spatial régulier ou périodique stabilisé par les liaisons hydrogène (voir figure 1.2). Il existe deux principaux types de motifs :
 - Les hélices alpha : la protéine se replie en hélice droite, avec une liaison hydrogène entre le résidu n et le résidu $n+4$
 - Les feuillets bêta : il s'agit d'interactions entre des résidus beaucoup plus éloignés. La chaîne peptidique forme un "feuillet" en se repliant parallèle à elle-même
 Le reste de la protéine est replié de façon aléatoire ou en "coudes" β et autres structures plus simples.
- La structure tertiaire est l'ordonnancement entre elles des structures secondaires. C'est donc la structure globale de la protéine toute entière
- La structure quaternaire est l'agencement de plusieurs chaînes polypeptidiques entre elles

La structure en trois dimensions de la protéine active est qualifiée de structure native. Cette structure n'est pas codée par les gènes. Seule la structure primaire l'est. Nous allons tenter de comprendre en quoi le repliement de la protéine dans sa structure active est peu évident et aborder les différents modèles qui ont été imaginés pour l'expliquer.

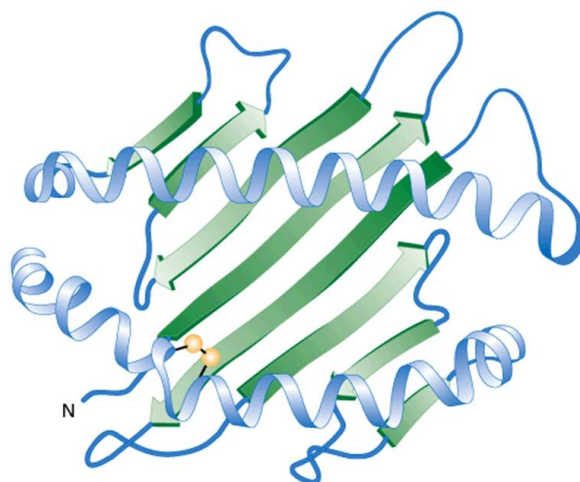


FIGURE 1.2 – Structure en 3 dimensions d'une protéine. En bleu les hélices alpha, en vert un feuillet bêta

1.2 Le repliement des protéines

1.2.1 Le Postulat d'Anfinsen

En 1961 Anfinsen a réalisé une expérience déterminante pour la représentation du repliement des protéines[5]. Son équipe et lui ont provoqué la dénaturation complète d'une ribonucléase en rompant tous les ponts disulfure de la protéine. Ils ont ensuite observé que la protéine était capable de se replier et de retrouver sans aide extérieure la structure native dans des conditions adéquates.

Anfinsen en a déduit un postulat qui porte son nom : Toute l'information nécessaire à l'acquisition de la structure native d'une protéine dans un environnement donné est contenue dans sa séquence.

Cela signifie que les protéines acquièrent leur structure native spontanément. Partant de ce postulat, on peut se demander alors comment il est possible que certaines protéines ne se replient pas correctement.

Se pose donc la question de savoir comment la protéine arrive à se replier dans sa structure native sans aide extérieure, et quels mécanismes sont mis en jeu au cours du repliement.

1.2.2 Les modèles de repliement

Le paradoxe de Levinthal

En 1968, Levinthal énonce le paradoxe suivant : si on considère une chaîne de 100 acides aminés, chacun d'entre eux pouvant adopter deux conformations spatiales, on dénombre alors 10^{30} configurations accessibles pour la chaîne. Admettons que la chaîne recherche la configuration la plus stable au hasard, que chaque changement entre deux configurations prenne 10^{-11} s. Alors la chaîne d'acides aminés mettrait 10^{11} ans à atteindre sa configuration stable, ce qui est plus que l'âge de l'univers.

Pour Levinthal, ce paradoxe montre que la configuration native d'une protéine n'est pas forcément la plus stable thermodynamiquement. De son point de vue, l'acquisition de la structure native est contrôlée principalement par les paramètres cinétiques du repliement.

Les modèles de repliement

Pour résoudre le paradoxe de Levinthal, les scientifiques se sont mis à la recherche d'intermédiaires de repliement, à travers des études de cinétique, qui permettraient d'expliquer la rapidité du processus. Ces études ont mis en évidence l'existence d'intermédiaires plus ou moins repliés, contenant des structures secondaires natives ou non natives.

Plusieurs modèles, plus ou moins valides, découlent de ces études.

Le modèle de la charpente ou framework model : dans ce modèle, les structures secondaires natives se forment en premier. La structure tertiaire vient ensuite. Ce modèle privilégie les interactions à courte distance.

Le modèle diffusion-collision : la nucléation de la protéine s'effectue simultanément en plusieurs endroits. Les structures ainsi créées diffusent, coalescent ou s'associent pour former des morceaux de

structure native. Le repliement global s'effectue en plusieurs étapes de diffusion-collision.

Le modèle de l'effondrement hydrophobe : le repliement commence au cœur hydrophobe de la protéine pour se propager ensuite au reste de la molécule. On privilégie dans ce modèle les interactions à grande distance.

D'autres modèles existent mais n'ont pas ou peu été confortés par l'expérience.

L'entonnoir de repliement

Il fallut attendre les années 1990 pour aboutir à une vision unifiée du phénomène de repliement.

On considère aujourd'hui que la protéine évolue, au cours du repliement, dans un paysage énergétique en forme d'entonnoir.

Cette vision résout le paradoxe de Levinthal : la protéine évolue au hasard d'une configuration à une autre, mais à mesure qu'elle se rapproche de la structure native, le paysage des configurations possibles se restreint.

La structure native, la plus stable, se trouve au fond de l'entonnoir, les intermédiaires de repliement sont des irrégularités dans les parois de l'entonnoir.

Ainsi, une même protéine peut se replier en passant par différents intermédiaires selon le chemin parcouru à la surface de l'entonnoir, comme illustré figure 1.3b.

Cette représentation permet d'expliquer les cinétiques de repliement monophasiques et multiphasiques ainsi que l'existence de phénomènes d'agrégation (qui correspondraient à des minima locaux dans la paroi de l'entonnoir).

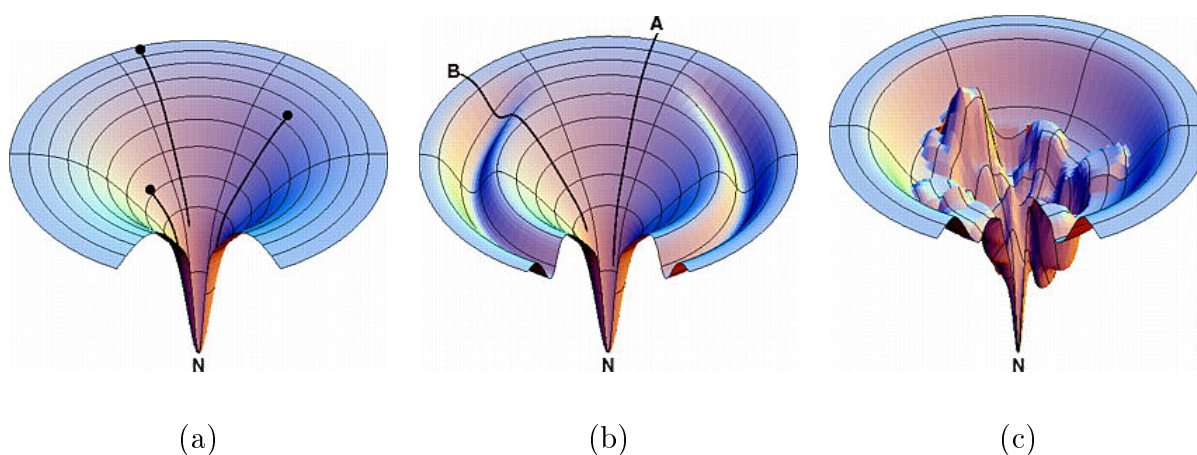


FIGURE 1.3 — Illustrations du concept d'entonnoir de repliement[6]. Au cours du repliement la protéine descend dans l'entonnoir jusqu'à atteindre la structure native. (a) Entonnoir idéalisé : le repliement se fait de la même façon quel que soit la trajectoire de la protéine à sa surface. (b) Cas d'un repliement pouvant se faire soit par un processus rapide (chemin A) soit par un processus lent (chemin B). (c) Entonnoir de repliement réel avec des barrières d'énergie, des pièges cinétiques ; le repliement peut alors avoir plusieurs états intermédiaires et suivre différents mécanismes

1.2.3 Pathologies

Plusieurs maladies ont pour origine un mauvais repliement d'une protéine[1]. Il s'agit entre autres de la maladie d'Alzheimer, du diabète de type II, de la maladie de Parkinson, des encéphalopathies spongiformes... Dans toutes ces maladies, une protéine subit un changement de configuration spatiale et s'agrège en fibrilles amyloïdes. Les protéines qui forment ces agrégats n'ont aucune analogie de séquence, leur seul point commun est de présenter parfois une conversion des hélices α en feuillets β via un intermédiaire présentant des régions déstabilisées ce qui conduit à l'agrégation. Lorsque ces protéines sont normalement repliées, il leur est impossible de former des fibrilles.

Pour certaines maladies, le changement de conformation résulte d'une mutation génétique.

Dans le cas des encéphalopathies spongiformes, le concept de "protein only" a été introduit pour expliquer que seule la protéine est à l'origine de la maladie et de sa transmission.

Dans la maladie d'Alzheimer, la protéine précurseur subit plusieurs ruptures protéolytiques libérant un peptide de 40 à 42 acides aminés. C'est ce peptide qui se replie en feuillets β et entraîne l'agrégation.

Ces maladies nous montrent que la structure native d'une protéine n'est pas stable et qu'elle peut subir de grands changements allant jusqu'à basculer des hélices aux feuillets. Ces changements peuvent être induits par une petite variation de la composition du milieu, ou par l'association à une protéine qui a déjà subi la conversion (cas du prion des encéphalopathies spongiformes). Il est donc important de connaître et de comprendre les mouvements ayant lieu dans les protéines, en particulier la conversion entre hélices α et feuillets β .

Nous allons maintenant aborder les propriétés optiques des protéines qui vont nous permettre de mesurer leur dynamique de repliement.

1.3 Activité optique des molécules chirales

Dans ce paragraphe nous allons expliquer l'origine du dichroïsme circulaire dans les protéines et expliciter l'intérêt de cette mesure dans la détermination de la structure.

1.3.1 La chiralité

Définition : Un objet est chiral s'il n'est pas superposable à son image dans un miroir[7].

On trouve des exemples simples d'objets chiraux dans la vie de tous les jours. Nos mains, images l'une de l'autre dans un miroir, ne sont pas superposables ; elles sont donc chirales. Il en est de même pour nos pieds, on ne peut en effet pas enfiler la chaussure droite sur le pied gauche, et inversement, cependant nos pieds sont image l'un de l'autre.

La chiralité prend sa source au niveau microscopique et tout particulièrement dans les molécules organiques. Si on considère le carbone tétraédrique, on peut voir tout de suite que s'il porte quatre

substituants différents il est chiral : un tel carbone est appelé carbone asymétrique (figure 1.4).

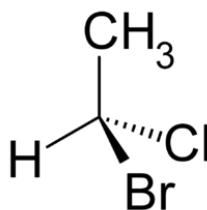


FIGURE 1.4 – Exemple de carbone asymetrique

Deux molécules chirales images l'une de l'autre dans un miroir sont appelées des énantiomères.

Dans les protéines, la chiralité intervient d'abord au niveau de l'acide aminé qui comporte un carbone asymétrique (sauf dans le cas de la Glycine, seul acide aminé non chiral où la chaîne latérale est réduite à un atome d'hydrogène).

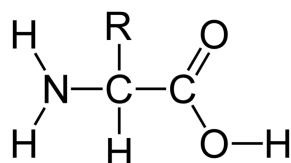


FIGURE 1.5 – Formule chimique d'un acide aminé. Le carbone central est asymétrique car il porte quatre substituants différents.

De plus, la chaîne polypeptidique peut se replier en des structures qui sont elles aussi chirales comme les hélices α . Ainsi, des molécules qui au départ ne sont pas forcément chirales, peuvent s'assembler pour former une structure qui sera chirale. C'est ce type de chiralité que l'on retrouve le plus en biologie.

1.3.2 L'activité optique

Les solutions de molécules chirales ou les cristaux chiraux présentent la particularité d'agir sur la polarisation d'une onde lumineuse les traversant : ces milieux présentent une activité optique.

L'activité optique a été découverte en 1811 par F. Arago sur un cristal de quartz. Elle a été ensuite observée par J.B. Biot dans des échantillons liquides comme l'essence de thérébenthine.

Le terme d'activité optique regroupe plusieurs effets d'un milieu sur une onde polarisée que nous allons maintenant détailler.

Rappels de polarisation

La polarisation de la lumière correspond aux directions prises par le champ électrique (ou magnétique) lors de la propagation quand on regarde l'onde venir vers soi.

La lumière non polarisée a un champ électrique qui décrit des directions aléatoires au cours du temps.

La lumière polarisée linéairement (ou rectiligne) voit son champ électrique osciller suivant une direction fixe. Si on place deux axes orthogonaux x et y dans le plan perpendiculaire à la direction de propagation, une onde polarisée linéairement peut s'écrire vectoriellement (en notation de Jones[8]) comme :

$$\vec{E} = A \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (1.1)$$

où l'axe x est choisi parallèle à la direction de polarisation.

La lumière polarisée circulairement correspond au cas où l'extrémité du champ électrique décrit un cercle quand on regarde l'onde se propageant vers soi. Si le champ tourne dans le sens horaire, l'onde est circulaire droite et s'écrit :

$$\vec{E} = \frac{A}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 \\ -i \end{pmatrix} \quad (1.2)$$

Si le champ tourne dans le sens anti-horaire, l'onde est circulaire gauche et s'écrit :

$$\vec{E} = \frac{A}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 \\ i \end{pmatrix} \quad (1.3)$$

Une onde polarisée elliptiquement peut être gauche ou droite, comme l'onde circulaire, et s'écrit :

$$\vec{E} = \begin{pmatrix} A \\ iB \end{pmatrix} \quad (1.4)$$

Le pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire est la propriété d'un milieu à faire tourner le plan de polarisation d'une onde rectiligne le traversant. On distingue les milieux lévogyres et dextrogyres comme faisant tourner respectivement dans le sens anti-horaire et le sens horaire la polarisation d'une onde lorsque l'observateur regarde en direction de la source.

Deux énantiomères d'une même molécule chirale présentent un pouvoir rotatoire de même intensité mais de sens opposé. Si l'on mélange deux énantiomères en égales proportions (mélange racémique), la solution obtenue n'a pas de pouvoir rotatoire.

Le pouvoir rotatoire s'explique facilement lorsqu'on décompose une onde polarisée linéairement

en deux ondes polarisées circulairement et de sens opposé ce qui s'écrit vectoriellement :

$$\vec{E}_{incident} = A \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} = \frac{A}{2} \begin{pmatrix} 1 \\ i \end{pmatrix} + \frac{A}{2} \begin{pmatrix} 1 \\ -i \end{pmatrix} \quad (1.5)$$

Le pouvoir rotatoire est issu du fait que chacune de ces ondes circulaires voit un indice de réfraction différent dans le milieu : indices n_g et n_d respectivement pour l'onde circulaire gauche et l'onde circulaire droite. Si l'on considère que le champ électrique de longueur d'onde λ traverse une épaisseur l de milieu, le champ à la sortie s'écrit :

$$\begin{aligned} \vec{E}_{sortant} &= \frac{A}{2} e^{i \frac{2\pi}{\lambda} n_g l} \begin{pmatrix} 1 \\ i \end{pmatrix} + \frac{A}{2} e^{i \frac{2\pi}{\lambda} n_d l} \begin{pmatrix} 1 \\ -i \end{pmatrix} \\ &= \left[\frac{A}{2} e^{i \frac{2\pi}{\lambda} \frac{(n_g - n_d)}{2} l} \begin{pmatrix} 1 \\ i \end{pmatrix} + \frac{A}{2} e^{i \frac{2\pi}{\lambda} \frac{(n_d - n_g)}{2} l} \begin{pmatrix} 1 \\ -i \end{pmatrix} \right] e^{i \frac{2\pi}{\lambda} \frac{(n_d + n_g)}{2} l} \end{aligned} \quad (1.6)$$

On définit l'angle de rotation θ par :

$$\theta = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{(n_d - n_g)}{2} l \quad (1.7)$$

L'expression du champ sortant se simplifie :

$$\begin{aligned} \vec{E}_{sortant} &= \frac{A}{2} e^{i \frac{2\pi}{\lambda} \frac{(n_d + n_g)}{2} l} \begin{pmatrix} e^{-i\theta} + e^{i\theta} \\ i(e^{-i\theta} - e^{i\theta}) \end{pmatrix} \\ &= A e^{i \frac{2\pi}{\lambda} \frac{(n_d + n_g)}{2} l} \begin{pmatrix} \cos(\theta) \\ -i \sin(\theta) \end{pmatrix} \end{aligned} \quad (1.8)$$

On voit que le champ a tourné d'un angle θ par rapport à sa direction initiale. Le signe de θ dépend des indices vus par les polarisations circulaires gauche et droite.

Le dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est la différence d'absorption entre une onde polarisée circulairement gauche et une onde polarisée circulairement droite[7].

Notons α_g et α_d les coefficients d'absorption respectivement pour une onde polarisée circulairement gauche et droite.

Alors :

$$CD = (\alpha_g - \alpha_d)l \quad (1.9)$$

où l est la longueur de milieu traversé.

Si l'on décompose une onde polarisée linéairement en deux ondes polarisées circulairement comme précédemment, et que cette onde traverse un milieu présentant un dichroïsme circulaire on obtient :

$$\vec{E}_{sortant} = \frac{A}{2}e^{-\alpha_g l} \begin{pmatrix} 1 \\ i \end{pmatrix} + \frac{A}{2}e^{-\alpha_d l} \begin{pmatrix} 1 \\ -i \end{pmatrix} \quad (1.10)$$

$$= \frac{1}{2} \begin{pmatrix} A_g + A_d \\ i(A_g - A_d) \end{pmatrix} \quad (1.11)$$

Où $A_g = Ae^{-\alpha_g l}$ et $A_d = Ae^{-\alpha_d l}$. A la sortie du milieu, l'onde est polarisée elliptiquement.

Résumé

L'effet de la traversée d'un milieu présentant une activité optique sur une onde polarisée linéairement suivant l'axe x est résumé sur la figure 1.6. L'onde résultante est une onde polarisée elliptiquement dont le grand axe a tourné d'un angle θ par rapport à la direction de polarisation initiale.

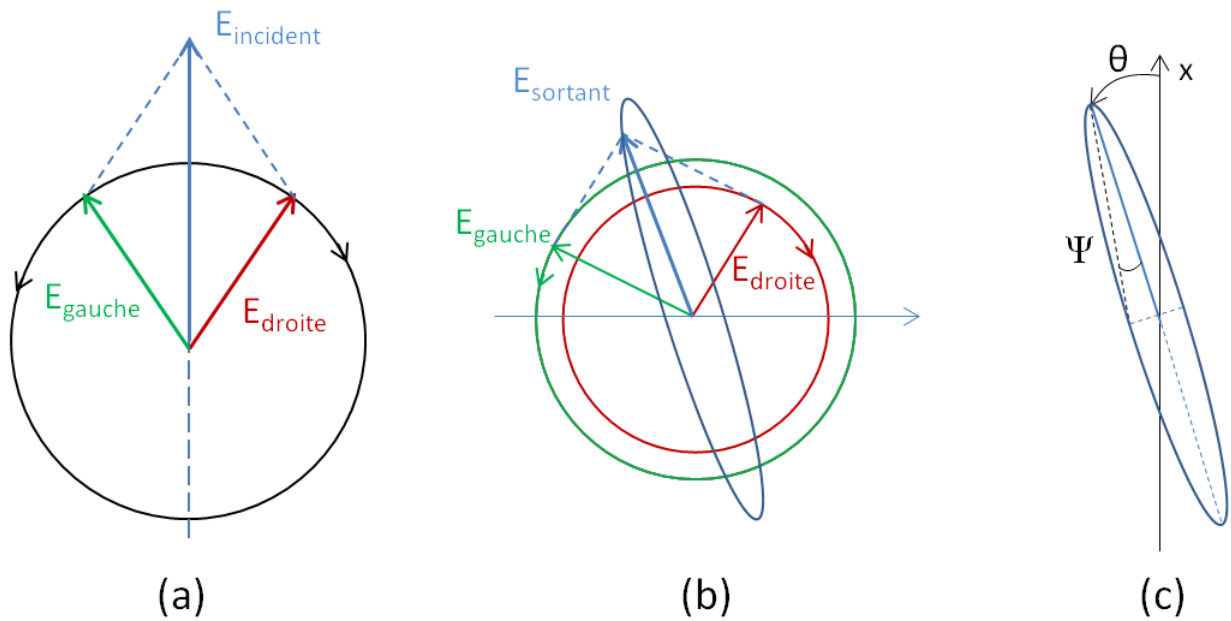


FIGURE 1.6 – Schémas représentant les modifications du champ électrique à la traversée d'un milieu optiquement actif. (a) Champ électrique incident polarisé linéairement décomposé en ondes circulaires gauche et droite. (b) Les ondes gauche et droite sont absorbées et déphasées de façon différente à la traversée du milieu ; elles se recomposent à la sortie en une onde elliptique inclinée. (c) La direction du grand axe de la polarisation elliptique est inclinée d'un angle θ par rapport à la direction de polarisation incidente : c'est l'angle de rotation optique. L'ellipticité de la polarisation sortante est donnée par l'angle Ψ

Nous pouvons exprimer l'ellipticité de la polarisation sortante en fonction des amplitudes du champ électrique suivant les petit et grand axe :

$$\Psi \simeq \tan \psi = \frac{A_{\text{sortant,petit axe}}}{A_{\text{sortant,grand axe}}} = \frac{A_g - A_d}{A_g + A_d} = \frac{Ae^{-\alpha_g l} - Ae^{-\alpha_d l}}{Ae^{-\alpha_g l} + Ae^{-\alpha_d l}} \quad (1.12)$$

En général $\alpha_{g,d} \ll 1$, alors :

$$|\Psi| \simeq \frac{|\alpha_g - \alpha_d| \cdot l}{4} \quad (1.13)$$

La mesure de l'ellipticité Ψ donne donc accès à la valeur du dichroïsme circulaire de l'échantillon.

1.4 Expressions et unités du dichroïsme circulaire

Il existe deux façons de mesurer le dichroïsme circulaire :

- en mesurant directement l'absorption pour une onde circulaire gauche et une onde circulaire droite
- en mesurant l'ellipticité introduite par le milieu sur une onde incidente rectiligne

Associées à ces deux types de mesures, deux unités sont couramment utilisées pour déterminer le dichroïsme circulaire.

Pour les mesures liées à l'absorption, on peut exprimer le dichroïsme circulaire en terme de coefficient d'extinction molaire ϵ en $M^{-1}.cm^{-1}$. L'extinction molaire est reliée au coefficient d'absorption via la loi de Beer-Lambert et l'absorbance :

$$\epsilon = \frac{A}{c \cdot l} = \frac{\alpha}{\ln(10)c} \quad (1.14)$$

Avec $10^{-A} = e^{-\alpha \cdot l}$, c la concentration en $mol.L^{-1}$ et l l'épaisseur de l'échantillon traversé en cm. Ainsi en $mol^{-1}.L.cm^{-1}$:

$$CD = \Delta\epsilon = \epsilon_g - \epsilon_d \quad (1.15)$$

$$= \frac{1}{c \cdot l} (A_g - A_d) \quad (1.16)$$

$$= \frac{1}{\ln(10)c} (\alpha_g - \alpha_d) \quad (1.17)$$

Si la mesure se fait via l'ellipticité on exprimera le dichroïsme circulaire en terme d'ellipticité molaire, en $mol^{-1}.L.cm^{-1}$:

$$CD = [\Psi] = \frac{\Psi}{c \cdot l} \quad (1.18)$$

Ces deux expressions présentent l'avantage d'être indépendantes de la concentration et de la longueur de l'échantillon traversé et permettent ainsi une comparaison rigoureuse des résultats obtenus. De plus il est facile de passer d'une valeur à l'autre. Pour le comprendre nous allons partir de l'équation 1.13 reliant le dichroïsme circulaire, exprimé en coefficient d'absorption à la valeur absolue de l'ellipticité ψ en radians :

$$|\Psi| = \frac{180}{\pi} \frac{1}{4} \cdot \Delta\alpha \cdot l = \frac{180}{\pi} \frac{\ln(10)c \cdot l}{4} \Delta\epsilon \quad \text{en degrés} \quad (1.19)$$

A l'aide de l'équation 1.18 on obtient la relation :

$$[\Psi] = 32,98\Delta\epsilon \text{ en } \text{deg.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1} \quad (1.20)$$

Il est à noter que dans la plupart des publications l'ellipticité est notée θ . L'unité dans laquelle on l'exprime est très variable.

Dans nos expériences, nous mesurons le CD sous la forme :

$$CD = (\alpha_g - \alpha_d)l \quad (1.21)$$

avec l la longueur de la cuve. Alors nos mesures de CD sont sans unités. Cependant il est possible de retrouver la valeur du CD en $g^{-1}.L.cm-1$ si la concentration en $g.L^{-1}$ de l'échantillon est connue.

1.5 Le dichroïsme circulaire dans les protéines

Dans ce paragraphe nous allons détailler les différentes sources de dichroïsme circulaire dans les protéines[9].

Notons d'abord qu'on ne peut observer de signal de dichroïsme circulaire qu'à des longueurs d'onde qui correspondent à des bandes d'absorption de la molécule. Les bandes spectrales sont souvent attribuées à différents types de transitions et donc à différentes structures. On peut donc de la même façon attribuer les signaux de dichroïsme circulaire aux structures qui nous intéressent.

Un signal de dichroïsme circulaire peut apparaître quand un chromophore est chiral pour une des raisons suivantes :

- Le chromophore est intrinsèquement chiral, il comporte par exemple un carbone asymétrique
- Le chromophore est lié par une liaison covalente à un centre chiral de la molécule
- Le chromophore est placé dans un environnement asymétrique à cause de la structure 3D adoptée par la molécule

Ces différentes sources de chiralité permettent d'entrevoir en quoi le dichroïsme circulaire donne beaucoup d'informations sur les protéines.

Selon la longueur d'onde, le spectre de dichroïsme circulaire d'une protéine peut apporter différentes informations :

En dessous de 240 nm, l'absorption est due à la liaison peptidique. Le spectre de dichroïsme circulaire à ces longueurs d'onde va donc donner des informations sur la structure secondaire de la protéine. En effet le spectre d'une hélice α , d'un feuillet β ou d'une pelote statistique sont très différents (voir figure 1.7). L'analyse du spectre de dichroïsme circulaire d'une protéine dans cette gamme de longueur d'onde peut permettre de calculer précisément la proportion d'hélices et de feuillets dans la molécule.

Le spectre d'absorption entre 260 et 320 nm provient des chaînes latérales des acides aminés. Chaque acide aminé possède sa propre structure de bandes d'absorption. Cette zone du spectre peut être considérée comme une empreinte digitale de la protéine. Dans cette gamme spectrale, le signal de dichroïsme circulaire va dépendre des positions relatives des acides aminés, de leur environnement

tridimensionnel, leur mobilité ainsi que de la quantité de chaque acide aminé. On a donc accès ici à une information sur la structure tertiaire de la protéine. Bien que cette zone spectrale soit difficile à interpréter quantitativement, elle peut permettre de différencier une protéine mutante d'une protéine naturelle et ainsi déterminer si une perte d'activité est due à un changement de structure tertiaire.

L'analyse du spectre de dichroïsme circulaire peut aussi donner des informations sur les sites de liaison de cofacteurs tels que les hèmes ou les chromophores dans une protéine. Certains cofacteurs sont achiraux lorsqu'ils sont seuls en solution, mais présentent un signal de dichroïsme circulaire lorsqu'ils sont liés à la protéine : cela vient du fait que l'environnement tridimensionnel du cofacteur est chiral. Ainsi on peut savoir si le site de fixation du cofacteur est modifié en observant le signal de dichroïsme circulaire du cofacteur lui même.

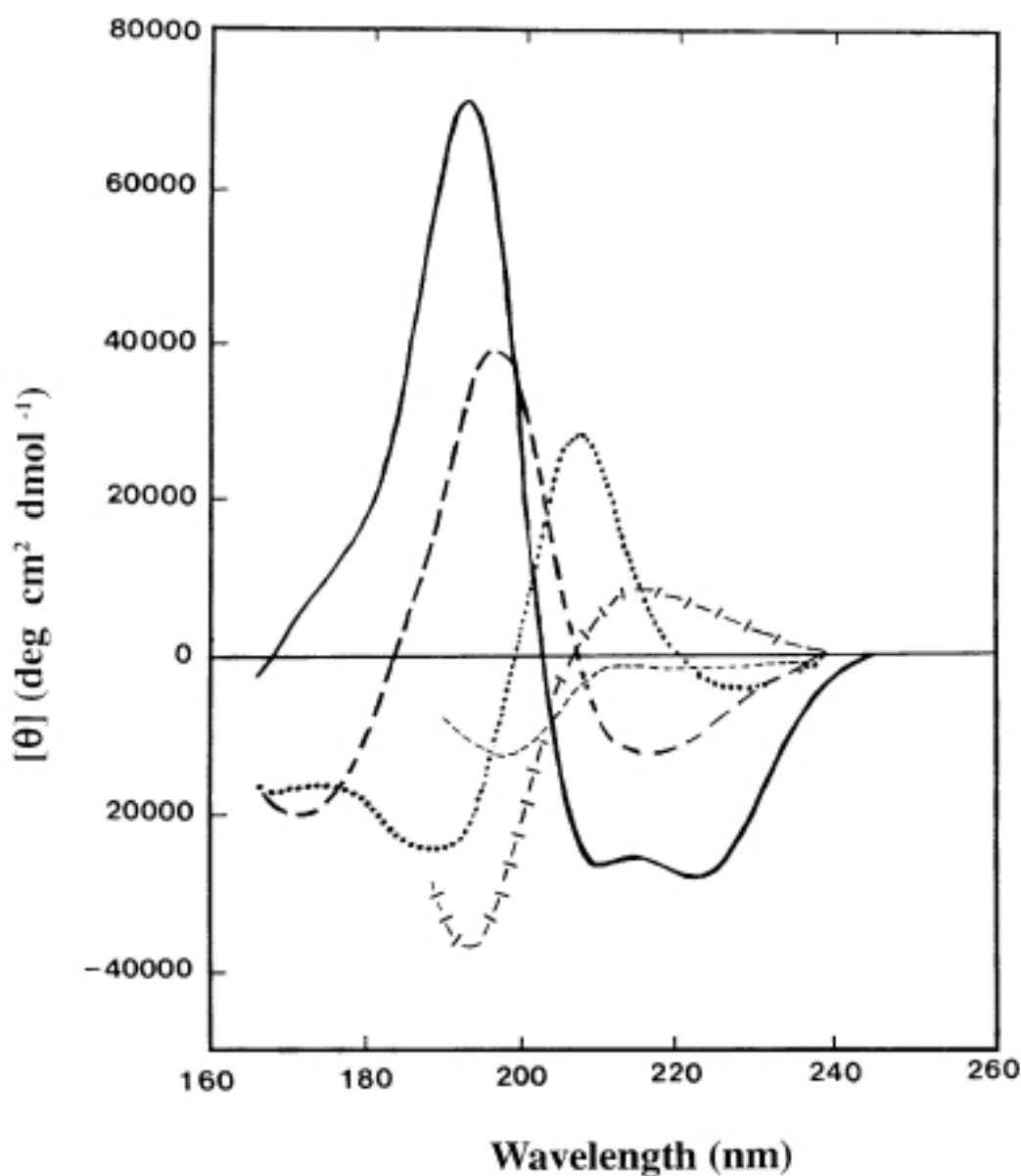


FIGURE 1.7 – Spectres de différentes structures secondaires dans l'UV lointain[9]. Trait plein : hélice α. Tirets longs : feuillets β. Pointillés : coudes β. Petits tirets : structure irrégulière

Le dichroïsme circulaire est donc un outil puissant pour étudier la structure des protéines. Couplé

aux expériences pompe-sonde, il permet d'accéder en temps réel aux changements de conformation des protéines.

Chapitre 2

Mesures dynamiques dans les protéines

2.1 Choix de la méthode

Le repliement des protéines est un processus qui met en jeu différentes échelles temporelles. La formation des structures secondaires se fait sur des durées entre 10 ns et 1 ms[10] tandis que la formation des structures tertiaires et quaternaire natives peut prendre jusqu'à plusieurs heures[11].

Il est important, si l'on veut comprendre le repliement des protéines, de pouvoir étudier ces différentes étapes. Le facteur limitant est donc la résolution temporelle de la méthode utilisée.

Dans cette partie, je décrirai rapidement les différentes méthodes de mesure et d'initiation du repliement les plus couramment utilisées.

2.1.1 Les principales techniques d'observation

L'observation des dynamiques de repliement des protéines ou de leurs mouvements au cours de leur activité a fait l'objet de nombreuses expériences qui ont permis de développer plusieurs techniques. Le choix d'une technique d'observation dépend des objectifs de l'expérience, de la protéine à étudier, des informations que l'on souhaite obtenir. Les techniques les plus utilisées[10, 12] sont résumées dans le tableau 2.1.

Nous avons choisi d'utiliser le dichroïsme circulaire car, selon le choix de la longueur d'onde utilisée, il nous permet d'obtenir des informations quantitatives sur le pourcentage d'hélices alpha de la structure secondaire (dépliement du PGA), sur le mouvement des hélices alpha dans la protéine (bactériorhodopsine) ou d'un chromophore par rapport au reste de la protéine (PYP). De plus, la mesure du dichroïsme circulaire peut s'effectuer en solution aqueuse dans des conditions proches des conditions natives de la protéine (ce n'est pas le cas par exemple pour les mesures infra-rouges, qui doivent s'effectuer dans une solution de D_2O) ce qui simplifie la préparation des échantillons et apporte de la pertinence aux résultats expérimentaux.

Technique	Type d'information	Détails
Absorption	Information sur le changement d'environnement d'un chromophore	Lorsque le chromophore se déplace au cours du repliement, il change d'environnement ce qui déplace ses bandes d'absorption.
Fluorescence	Selon la nature du fluorophore, on peut obtenir des informations locales ou globales sur le repliement de la protéine	<ol style="list-style-type: none"> 1. L'observation de la fluorescence de certains acides aminés aromatiques renseigne sur les variations de leur environnement 2. L'ajout d'un couple de fluorophores donneur/accepteur à deux extrémités de la protéine renseigne sur le mouvement relatif des deux zones de la protéine
Absorption Infrarouge	Donne une information globale sur la structure secondaire	La bande d'absorption à 1650 cm^{-1} , impliquant les vibrations de la liaison C=O de la chaîne peptidique, subit un décalage lors d'une variation de structure secondaire.
Dichroïsme circulaire	Donne une information globale sur le contenu en structure secondaire	Le dichroïsme circulaire est utilisé pour sonder de manière quantitative la structure secondaire.
Spectroscopie Raman	Informations locales et globales	Permet d'observer la structure secondaire ou des changements de structures plus localisés selon le chromophore étudié

TABLE 2.1 – Principales techniques d'observation de dynamique moléculaire

2.1.2 Initiation de la dynamique moléculaire

Afin de pouvoir observer le repliement, le dépliement ou les mouvements d'une protéine, il faut disposer d'une méthode pour initier le processus. De cette phase d'initiation du processus dépend la résolution temporelle de la mesure. En effet on ne peut pas mesurer sur une échelle de temps plus courte que celle de l'initiation.

Dans le tableau 2.2 sont présentées les principales méthodes d'initiation utilisées pour déclencher le repliement, le dépliement ou un changement de conformation des protéines[10, 12].

Technique	Résolution temporelle	Détails
Saut de température	Durée de l'impulsion laser et de l'homogénéisation de la température : quelques dizaines de ps	Avantage : Peut s'appliquer à n'importe quelle protéine dans des conditions natives Inconvénient : Cette méthode est la plupart du temps limitée à l'étude du dépliement ¹ : l'augmentation de température déplace l'équilibre de la protéine et cette dernière se déplie pour être en accord avec les nouvelles conditions thermodynamiques
Mélange rapide	Dizaines de microsecondes	Avantage : S'applique à toutes les protéines Inconvénient : demande de grands volumes de solution
Déclenchement photoinduit	Dépend de la vitesse du processus photochimique : jusqu'à quelques picosecondes	Il faut que la protéine possède une ou des liaisons, ou un chromophore, qui puissent être rompues ou excitées par l'absorption d'un photon

TABLE 2.2 – Principales techniques d'initiation de dynamique dans les protéines

Les méthodes utilisant les impulsions laser sont les plus performantes en ce qui concerne la résolution temporelle. Elles permettent d'observer des phénomènes à l'échelle de la picoseconde.

2.2 Mesure directe du dichroïsme circulaire avec la cellule de Pockels

Le dichroïsme circulaire correspondant à la différence d'absorption entre une onde polarisée circulairement gauche et une onde polarisée circulairement droite, on peut le mesurer directement par absorption, à condition de pouvoir générer ces deux types de polarisation sur un même faisceau laser sonde. Nous allons voir comment utiliser les milieux anisotropes et la cellule de Pockels pour générer alternativement des ondes polarisées droite et gauche.

1. Certaines protéines subissent une dénaturation à froid. Si l'on place la protéine à une basse température correspondant à un état dénaturé, le saut de température peut mener au repliement de la protéine

2.2.1 Génération d'onde polarisée circulairement

Les milieux anisotropes

Les milieux anisotropes sont des milieux transparents qui ne présentent pas le même indice optique selon la direction de polarisation de l'onde lumineuse qui les traverse.

Les indices vus par les différentes polarisations de l'onde lumineuse peuvent être obtenus simplement en utilisant la construction géométrique de l'ellipsoïde des indices[13]. Pour un milieu uniaxe (présentant deux indices optiques différents) l'ellipsoïde est de révolution autour d'un axe qu'on appelle l'axe optique : ses demi axes ont pour longueur n_e et n_o . L'indice vu par une onde polarisée suivant l'axe optique est l'indice extraordinaire n_e . L'indice vu par une onde se propageant suivant l'axe optique est l'indice ordinaire n_o .

Pour une direction de propagation et de polarisation quelconque il est nécessaire de déterminer les directions propres de vibration. Il faut considérer l'intersection entre l'ellipsoïde des indices et le plan d'onde passant par le centre de l'ellipsoïde : on obtient une ellipse de demi axes n_o et n (figure 2.1). Les axes de cette ellipse sont les directions propres de polarisation. Pour connaître l'effet du milieu anisotrope sur le champ qui s'y propage, il faut projeter le champ \vec{E} sur ces deux directions puis calculer le déphasage de chaque composante dû à la propagation dans un milieu d'indice n_o ou n .

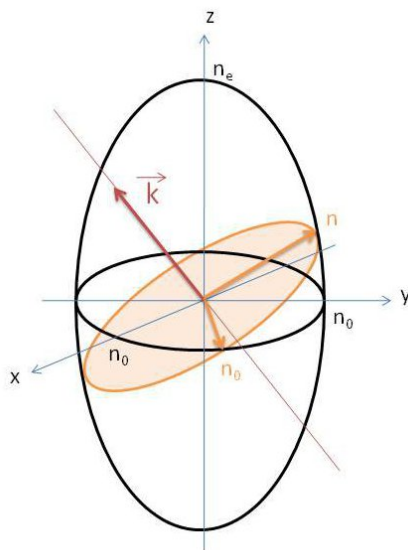


FIGURE 2.1 – Propagation d'une onde dans un milieu anisotrope. On retrouve les indices vus par l'onde sur l'intersection entre le plan d'onde et l'ellipsoïde des indices. Les vecteurs oranges représentent alors les deux polarisations propres, ces deux polarisations se propagent en voyant respectivement l'indice n_o et l'indice n . On doit projeter le champ incident sur ces deux directions pour calculer l'effet du milieu anisotrope

Je n'irai pas plus loin dans ce paragraphe. Cette approche est très simplifiée car nous n'avons pas abordé le problème de la double réfraction au moment de l'entrée de l'onde dans le milieu.

En pratique, nous utilisons en optique des lames anisotropes à faces parallèles dont la direction de l'axe optique est connue et parallèle à la face d'entrée du cristal. Nous allons voir dans le paragraphe

suivant comment de telles lames peuvent permettre d'obtenir des ondes polarisées circulairement.

Lame à retard

Une lame à retard est un milieu anisotrope taillé en lame à faces parallèles de façon à ce que l'axe optique soit parallèle aux faces de la lame.

Considérons une onde lumineuse polarisée linéairement de pulsation ω en incidence normale sur la lame à retard (figure 2.2).

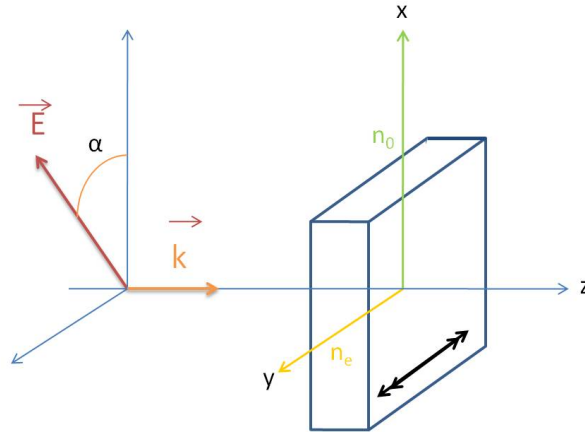


FIGURE 2.2 – Onde incidente sur une lame à retard. L'axe optique de la lame est représenté par une double flèche. Les axes neutres de la lame sont placés suivant les axes x et y. Les polarisations selon ces axes voient respectivement les indices n_o et n_e

Le champ électrique forme un angle α avec l'axe x. Nous pouvons écrire sa décomposition sur les axes de la lame en $z = 0$:

$$\vec{E}(z, t) = E_0 \begin{pmatrix} \cos(\omega t) \cos(\alpha) \\ \cos(\omega t) \sin(\alpha) \end{pmatrix} \quad (2.1)$$

La polarisation suivant x va se propager dans la lame en voyant un indice optique n_o tandis que la polarisation suivant y verra un indice n_e . Après une épaisseur L de lame anisotrope, le champ électrique s'écrit :

$$\vec{E}(z, t) = E_0 \begin{pmatrix} \cos(\omega t - \frac{2\pi}{\lambda} n_e L) \cos(\alpha) \\ \cos(\omega t - \frac{2\pi}{\lambda} n_o L) \sin(\alpha) \end{pmatrix} \quad (2.2)$$

Les deux composantes sont déphasées de :

$$\phi = \frac{2\pi}{\lambda} (n_e - n_o) L \quad (2.3)$$

En choisissant l'épaisseur de la lame on peut donc choisir le déphasage entre les deux polarisations de l'onde.

Lame quart d'onde

Une lame quart d'onde introduit un déphasage de $\frac{\pi}{2}$ entre les deux polarisations du champ électrique :

$$\vec{E}(z, t) = E_0 \begin{pmatrix} \cos(\omega t) \cos(\alpha) \\ \cos(\omega t + \frac{\pi}{2}) \sin(\alpha) \end{pmatrix} = E_0 \begin{pmatrix} \cos(\omega t) \cos(\alpha) \\ \sin(\omega t) \sin(\alpha) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} E_{0x} \cos(\omega t) \\ E_{0y} \sin(\omega t) \end{pmatrix} \quad (2.4)$$

Si l'angle α est quelconque, la lame quart d'onde transforme une onde polarisée rectilignement en une onde elliptique de demi axes E_{0x} et E_{0y} alignés sur les axes de la lame.

Si l'angle α est égal à 45° , alors $E_{0x} = E_{0y} = \frac{E_0}{\sqrt{2}}$ et l'onde obtenue est une onde polarisée circulairement.

Le sens de rotation du champ électrique dépend de son orientation par rapport aux axes neutres de la lame à l'entrée de celle-ci ² (figure 2.3).

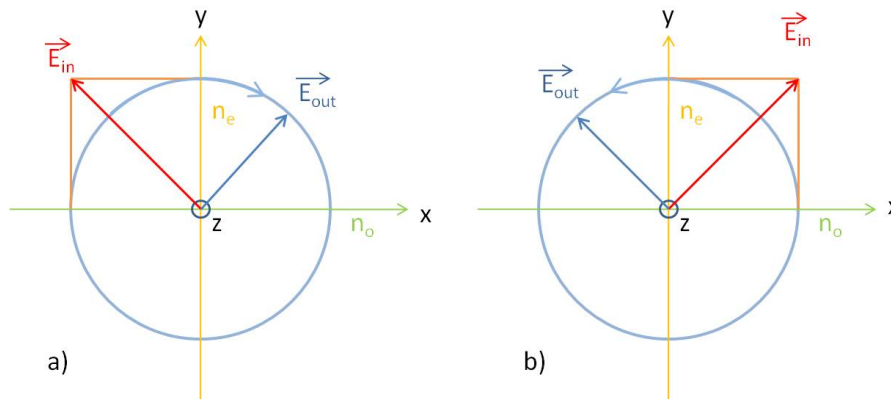


FIGURE 2.3 – Sens de rotation de l'onde circulaire créée avec une lame quart d'onde. a) Génération d'une onde circulaire droite. b) Génération d'une onde circulaire gauche

Ainsi une lame quart d'onde nous permet de créer des ondes polarisées circulairement droite ou gauche. Cependant si nous voulons pouvoir alterner entre ces deux polarisations, il faudrait être capable de changer rapidement et précisément la direction de polarisation linéaire de l'onde incidente. Une autre solution est de pouvoir contrôler le déphasage de la lame pour le faire alterner entre $\frac{\pi}{2}$ et $-\frac{\pi}{2}$: c'est possible grâce à l'effet Pockels.

2.2.2 La cellule de Pockels

L'effet Pockels

L'effet Pockels est un effet électrooptique linéaire. Il s'agit d'une modification de l'ellipsoïde des indices lorsque le milieu est soumis à une forte tension électrique. Cet effet n'apparaît que dans les milieux non centrosymétriques.

On considère un milieu transparent soumis à la fois à un champ électrique lumineux E^{opt} et à un champ électrique lentement variable E^{mod} tels que $\|E^{mod}\| \gg \|E^{opt}\|$. Alors l'ellipsoïde des indices est déformé et son équation dans le système d'axes propres devient :

2. Si on considère une lame "moins" quart d'onde, le déphasage introduit est $-\frac{\pi}{2}$ et la situation est inversée.

$$\begin{aligned} & \left[\frac{1}{n_x^2} + \Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{xx} \right] x^2 + \left[\frac{1}{n_y^2} + \Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{yy} \right] y^2 + \left[\frac{1}{n_z^2} + \Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{zz} \right] z^2 \\ & + 2\Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{yz} yz + 2\Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{xz} xz + 2\Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{xy} xy = 1 \end{aligned} \quad (2.5)$$

A l'ordre le plus bas, la variation d'indice $\Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{ij}$ peut s'écrire en un développement en fonction des champs électriques sous la forme :

$$\Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{ij} = \sum_{k=1}^3 r_{ijk} E_k^{mod} \cos(\omega_{mod} t) + \sum_{k=1}^3 \sum_{l=1}^3 \rho_{ijkl} E_k^{mod} E_l^{mod} \cos^2(\omega_{mod} t) \quad (2.6)$$

Le premier terme correspond à un effet de biréfringence linéaire induite par le champ électrique : c'est l'effet Pockels. L'effet Pockels ne peut être observé que dans les milieux non centrosymétriques. Dans un milieu centrosymétrique, le tenseur electro-optique $[r]$ est nul à cause de l'invariance des propriétés optiques du milieu par inversion : le milieu ne présente pas alors d'effet Pockels.

Le deuxième terme correspond à un effet de biréfringence quadratique appelé effet Kerr. L'existence de cet effet va dépendre des coefficients du tenseur $[\rho]$: en général un même milieu ne présente pas les deux effets.

En considérant seulement le terme :

$$\Delta \left(\frac{1}{n^2} \right)_{ij} = \sum_{k=1}^3 r_{ijk} E_k^{mod} \cos(\omega_{mod} t) \quad (2.7)$$

On voit que les variations d'indice sont proportionnelles au champ électrique appliqué au milieu. Le déphasage entre les directions de polarisations propres du cristal induit par la traversée de la lame va être proportionnel à la tension appliquée à la lame.

Nous allons voir dans le paragraphe suivant quelle est, pour notre cellule de Pockels, l'expression de la tension à appliquer pour obtenir une lame quart d'onde.

Utilisation de la cellule de Pockels

La cellule de Pockels est un dispositif électro-optique mettant à profit l'effet Pockels. Il s'agit d'un cristal non centrosymétrique auquel on applique une forte tension électrique.

Il existe deux types de cellules de Pockels :

- La cellule de Pockels transverse : le champ électrique appliqué est perpendiculaire à la direction de propagation du faisceau lumineux
- La cellule de Pockels longitudinale : le champ électrique appliqué est colinéaire à la direction de propagation du faisceau lumineux

Dans notre expérience nous utilisons une cellule de Pockels longitudinale constituée de KD*P³.

Pour ce cristal, la tension à appliquer pour obtenir une lame quart d'onde est donnée par la formule suivante :

$$V_{\lambda/4} = \frac{\lambda}{4n_o^3 r_{63}} \quad (2.8)$$

3. hydrogenophosphate de potassium enrichi en deuterium

n_o est l'indice de réfraction ordinaire du cristal et r_{63} ⁴ est le coefficient du tenseur electro-optique correspondant à la direction d'application de la tension.

La notice de la cellule de Pockels que nous utilisons nous donne $V_{\lambda/4} = 3.4kV$ à une longueur d'onde de 1064nm d'où la relation de proportionnalité entre la tension et la longueur d'onde : $V_{\lambda/4}(V) = 3.195\lambda(nm)$.

Nous pouvons ainsi aisément générer une lame quart d'onde quelle que soit la longueur d'onde du laser utilisé.

De plus, si l'on applique la tension $-V_{\lambda/4}$ les axes ordinaire et extraordinaire induits dans le cristal sont échangés par rapport au cas de la tension positive.

Nous pourrions donc, pour une polarisation incidente à 45° des axes de la lame, générer des ondes circulaires droite et gauche en changeant le signe de la tension, l'amplitude de la tension étant adaptée à la longueur d'onde étudiée.

2.2.3 Mesure du dichroïsme circulaire

En pratique nous mesurons le dichroïsme circulaire induit sur le faisceau sonde par la solution de protéines de la manière suivante.

La cellule de Pockels est alternativement alimentée par une tension positive ou négative correspondant à une lame quart d'onde pour la longueur d'onde sonde. Cette alternance est dirigée par le programme d'acquisition de l'ordinateur.

Un tube photomultiplicateur est chargé de recueillir le signal lumineux, et celui-ci est envoyé à un oscilloscope qui permet d'enregistrer l'intensité reçue au cours du temps.

Le programme demande à l'oscilloscope de stocker dans deux voies différentes l'intensité pour l'onde polarisée gauche et l'intensité pour l'onde polarisée droite et moyenne sur plusieurs acquisitions.

Ecrivons les intensités transmises pour ces deux ondes :

$$\begin{aligned} I_L &= I_0 \exp -\alpha_L l \\ I_R &= I_0 \exp -\alpha_R l \end{aligned} \tag{2.9}$$

I_L (resp I_R) est l'intensité transmise pour l'onde circulaire gauche (resp droite) et α_L (resp α_R) est le coefficient d'absorption pour cette onde.

Comme $(\alpha_L - \alpha_R)l$ est très petit devant 1 on peut écrire au premier ordre :

$$\begin{aligned} I_R - I_L &= I_0 e^{-\frac{\alpha_L + \alpha_R}{2}} (\alpha_L - \alpha_R) l \\ I_R + I_L &= 2I_0 e^{-\frac{\alpha_L + \alpha_R}{2}} \end{aligned} \tag{2.10}$$

4. en notation de Voigt les notations des indices du tenseur électro-optique sont réduites à 2 indices

On peut alors écrire le CD en fonction des intensités :

$$CD = (\alpha_L - \alpha_R)l = \frac{I_R - I_L}{\frac{I_R + I_L}{2}} \quad (2.11)$$

Après avoir enregistré les valeurs au cours du temps des deux intensités droite et gauche, il suffit donc pour connaître le dichroïsme circulaire de calculer la différence des deux courbes et de diviser par la moyenne.

2.2.4 Limitations de la méthode

L'alignement précis de la cellule de Pockels est très difficile et nécessite un protocole complexe[14]. Cette procédure est peu souvent utilisée, généralement nous vérifions l'alignement correct de la cellule grâce à un compensateur de Babinet-Soleil.

Lorsque la structure sondée par dichroïsme circulaire est la même que celle excitée par la pompe, un mauvais alignement de la cellule de Pockels peut faire apparaître de gros artefacts[15][16].

Tout d'abord, la pompe, si elle est polarisée linéairement, peut induire un dichroïsme linéaire dans le milieu (même si le milieu n'est pas chiral). Alors, si les ondes envoyées pour mesurer le CD ne sont pas parfaitement circulaires mais elliptiques elles peuvent présenter une différence d'absorption due au dichroïsme linéaire (voir figure 2.4 et [16]).

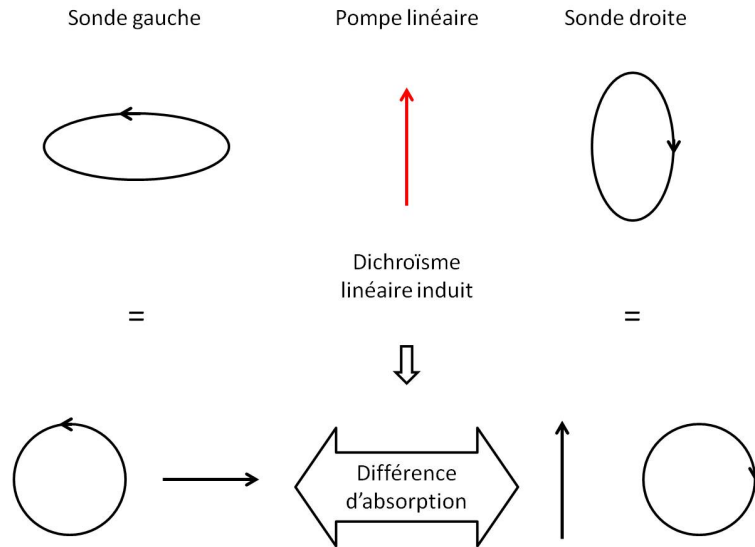


FIGURE 2.4 – On voit ici comment, si la pompe introduit un dichroïsme linéaire dans le milieu, des polarisations elliptiques ne seront pas absorbées de la même façon ce qui provoque la mesure d'un artefact de CD

C'est pourquoi cette méthode n'a pas été utilisée dans l'étude de la PYP car on y sonde et excite le même chromophore.

Cependant, la méthode de mesure du CD grâce à la cellule de Pockels s'applique bien sans nécessité d'un alignement parfait, dans les cas suivants :

- On excite un chromophore et on sonde la structure secondaire de la protéine (Bacteriorhodopsine)
- On chauffe la solution (T-jump) et on sonde la proportion d'hélices (PGA)

Nous retiendrons le fait que les polarisations ne sont pas parfaitement circulaires droite ou gauche mais sans doute légèrement elliptiques ce qui peut entacher la détermination d'une valeur absolue du dichroïsme circulaire⁵. En revanche cela n'est pas gênant si l'on cherche à mesurer une dynamique de CD : le fait qu'on ait des ondes elliptiques n'affectera pas la constante de temps du phénomène observé.

2.3 Mesure indirecte du dichroïsme circulaire avec le compensateur de Babinet-Soleil

2.3.1 Le compensateur de Babinet Soleil

Le compensateur de Babinet Soleil est un instrument d'optique permettant d'introduire un déphasage variable entre les deux directions de polarisation perpendiculaires d'une lumière le traversant.

Il est constitué d'une lame de quartz biréfringente à face parallèles et de deux prismes du même matériau d'axe orthogonal à celui de la lame (voir figure 2.5).

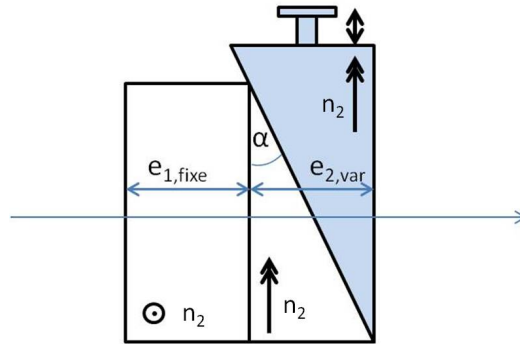


FIGURE 2.5 – Le compensateur de Babinet Soleil

Un des prismes est fixe et le second peut glisser verticalement sur le premier.

Notons n_1 et n_2 les deux indices du quartz. Nous ignorons dans quel sens sont orientés les axes extraordinaires des lames du Babinet-Soleil (ce point sera abordé plus loin).

On peut écrire le déphasage introduit par le compensateur de Babinet Soleil entre les composantes verticales et horizontales de l'onde lumineuse :

$$\phi_{BS} = \phi_{Y_{BS}} - \phi_{X_{BS}} = \frac{2\pi}{\lambda}(n_1 - n_2)(e_{1,fixe} - e_{2,var}) \quad (2.12)$$

où $e_{1,fixe}$ est l'épaisseur de la lame à faces parallèles et $e_{2,var}$ l'épaisseur des deux prismes. L'axe X_{BS} du Babinet Soleil correspond à l'axe le long duquel le prisme mobile se déplace.

Cette différence de phase peut être modifiée en faisant translater verticalement le second prisme et on remarque qu'elle est constante sur toute l'ouverture de l'appareil. Un faisceau lumineux large sera donc uniformément retardé. On remarque aussi que le compensateur de Babinet Soleil peut

5. Il est cependant possible de mesurer la non circularité des ondes grâce au compensateur de Babinet Soleil. Dans nos expériences les ondes sont polarisées circulairement à plus de 90%

être réglé pour avoir une différence de phase nulle. Il est donc intéressant d'utiliser cet outil pour introduire de petits déphasages.

2.3.2 Méthode de mesure du dichroïsme circulaire

Nous allons dans cette partie détailler la méthode de mesure du CD à l'aide du compensateur de Babinet-Soleil issue de [17].

Montage

Pour mesurer le dichroïsme circulaire induit par la pompe sur l'échantillon nous disposons du montage suivant présenté figure 2.6.

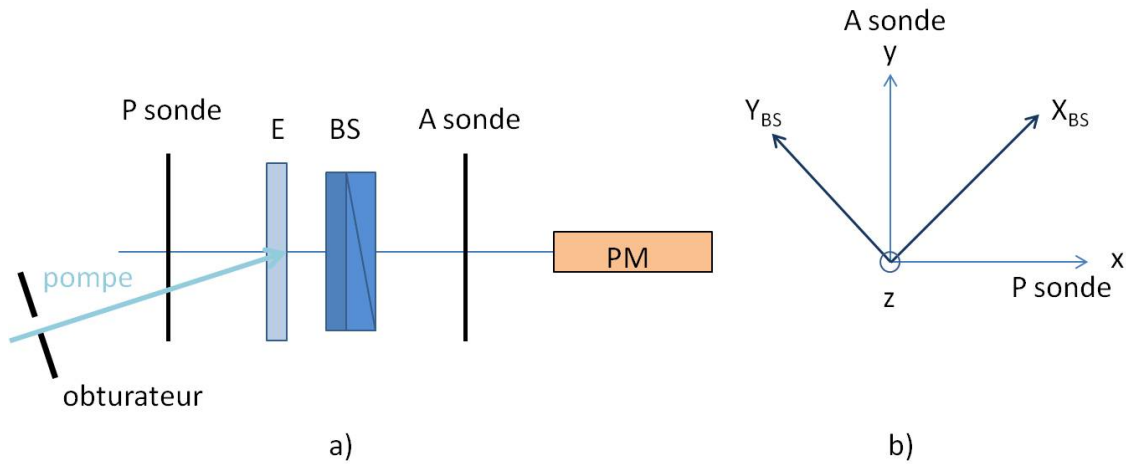


FIGURE 2.6 – (a) Le chemin parcouru par la pompe et la sonde. Les deux faisceaux pompe et sonde passent dans le même polariseur d'entrée afin d'être parfaitement parallèles. La pompe passe par un obturateur qui est commandé par le programme d'acquisition. (b) Orientation du Babinet Soleil par rapport à la polarisation incidente.

Le signal du PM est envoyé, via une carte d'acquisition, à l'ordinateur. Le programme d'acquisition permet d'enregistrer alternativement le signal reçu par le PM quand l'obturateur est passant ou fermé. Ces deux signaux avec et sans pompe sont tracés en fonction de la position des lames du Babinet Soleil. Nous verrons dans les paragraphes suivants quelle forme prend ce signal et comment on en déduit le dichroïsme circulaire induit par la pompe.

Intensité lumineuse reçue par le détecteur

Pour établir l'expression de l'intensité lumineuse en sortie du système nous allons utiliser la notation des matrices de Jones. Le champ électrique est représenté par un vecteur, tandis que les différents éléments optiques sont des opérateurs matriciels qui agissent sur le vecteur champ électrique. L'axe x du repère correspond à la direction de polarisation de l'onde incidente (polarisation horizontale). L'axe z est l'axe de propagation de la lumière. L'axe y se déduit des deux précédents pour former un repère (O, x, y, z) direct.

L'onde lumineuse traverse, dans l'ordre : l'échantillon, le Babinet Soleil puis l'analyseur croisé avec la direction de polarisation initiale. Chacun de ces éléments est représenté par une matrice : M_E , M_{BS} et M_A .

On peut alors écrire :

$$\vec{E}_{sortant} = M_A \cdot M_{BS} \cdot M_E \vec{E}_{incident} \quad (2.13)$$

Le champ incident est polarisé selon l'axe x du repère et a une amplitude A :

$$\vec{E}_{incident} = A \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.14)$$

Expression de la matrice M_A L'analyseur est un opérateur qui ne laisse passer que la direction y donc sa matrice est :

$$M_A = \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (2.15)$$

Expression de la matrice M_{BS} Pour décrire l'action du Babinet Soleil il nous faut d'abord projeter le champ électrique sur ses axes propres, à 45° des axes du polariseur et de l'analyseur. Dans le repère du Babinet soleil le champ s'écrit :

$$\vec{E}_{incident} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 \\ -1 \end{pmatrix} \quad (2.16)$$

A la sortie du Babinet Soleil, chaque composante a subi un déphasage en fonction de l'indice correspondant à sa direction de polarisation :

$$\vec{E}_{sortantBS} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} e^{i\frac{2\pi}{\lambda} n_{XBS}(e_1+e_2)} \\ -e^{i\frac{2\pi}{\lambda} n_{YBS}(e_1+e_2)} \end{pmatrix} = \frac{1}{\sqrt{2}} e^{i\frac{2\pi}{\lambda} \frac{(n_{XBS}+n_{YBS})}{2}(e_1+e_2)} \begin{pmatrix} e^{i\frac{2\pi}{\lambda} \frac{(n_{XBS}-n_{YBS})}{2}(e_1+e_2)} \\ -e^{i\frac{2\pi}{\lambda} \frac{(n_{YBS}-n_{XBS})}{2}(e_1+e_2)} \end{pmatrix} \quad (2.17)$$

Avec :

$$\begin{aligned} n_{XBS} &= \frac{n_1 e_1 + n_2 e_2}{e_1 + e_2} \\ n_{YBS} &= \frac{n_2 e_1 + n_1 e_2}{e_1 + e_2} \end{aligned} \quad (2.18)$$

En notant $\psi = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{(n_{XBS}+n_{YBS})}{2}(e_1+e_2)$ l'expression du champ en sortie du Babinet Soleil devient :

$$\vec{E}_{sortantBS} = \frac{1}{\sqrt{2}} e^{i\psi} \begin{pmatrix} e^{i\frac{\phi_{BS}}{2}} \\ -e^{-i\frac{\phi_{BS}}{2}} \end{pmatrix} \quad (2.19)$$

Si l'on projette maintenant le champ à nouveau dans le repère (O,x,y,z) on obtient :

$$\vec{E}_{sortantBS} = \frac{1}{2} e^{i\psi} \begin{pmatrix} \cos \frac{\phi_{BS}}{2} \\ i \sin \frac{\phi_{BS}}{2} \end{pmatrix} \quad (2.20)$$

L'action du compensateur de Babinet Soleil sur le champ électrique quand les axes du compensateur sont à 45° de l'axe de polarisation du champ (voir figure 2.6) peut se résumer par la matrice

suivante, où l'on a remplacé $\frac{\phi_{BS}}{2}$ par X_{BS} :

$$M_{BS} = \begin{pmatrix} \cos X_{BS} & i \sin X_{BS} \\ i \sin X_{BS} & \cos X_{BS} \end{pmatrix} \quad (2.21)$$

Expression de la matrice M_E A la traversée de l'échantillon chiral, les deux composantes circulaires de l'onde polarisée linéairement voient des indices optiques et des coefficients d'absorption différents, ce qui correspond au dichroïsme circulaire η et à la rotation optique θ . Je rappelle ici leurs définitions ainsi que celles du coefficient d'absorption moyen et de l'indice :

$$\begin{aligned} n &= (n_g + n_d)/2 \\ \theta &= \pi(n_d - n_g)l/\lambda \\ \alpha &= (\alpha_g + \alpha_d)/2 \\ \eta &= (\alpha_g - \alpha_d)l \end{aligned} \quad (2.22)$$

l est l'épaisseur d'échantillon traversée. Les indices g et d signifient gauche et droite.

On peut décomposer le champ électrique en une onde circulaire droite et une onde circulaire gauche en écrivant :

$$\vec{E}_{incident} = A \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} = \frac{A}{2} \begin{pmatrix} 1 \\ i \end{pmatrix} + \frac{A}{2} \begin{pmatrix} 1 \\ -i \end{pmatrix} \quad (2.23)$$

L'effet de l'échantillon sur chaque composante de l'onde peut ainsi être appliqué :

$$\begin{aligned} \vec{E}_{echantillon} &= \frac{A}{2} \begin{pmatrix} 1 \\ i \end{pmatrix} e^{i\frac{2\pi}{\lambda}n_g l} e^{-\frac{\alpha_g l}{2}} + \frac{A}{2} \begin{pmatrix} 1 \\ -i \end{pmatrix} e^{i\frac{2\pi}{\lambda}n_d l} e^{-\frac{\alpha_d l}{2}} \\ &= \frac{A}{2} e^{i\frac{2\pi}{\lambda}nl} e^{-\frac{\alpha l}{2}} \begin{pmatrix} e^{-i\theta} e^{-\frac{\eta}{4}} + e^{i\theta} e^{\frac{\eta}{4}} \\ i(e^{-i\theta} e^{-\frac{\eta}{4}} - e^{i\theta} e^{\frac{\eta}{4}}) \end{pmatrix} \\ &= \frac{A}{2} e^{i\frac{2\pi}{\lambda}nl} e^{-\frac{\alpha l}{2}} \begin{pmatrix} \cosh(\frac{\eta}{4} + i\theta) \\ -i \sinh(\frac{\eta}{4} + i\theta) \end{pmatrix} \end{aligned} \quad (2.24)$$

On peut alors définir la matrice de l'échantillon chiral telle que :

$$\vec{E}_{echantillon} = M_E A \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (2.25)$$

$$M_E = e^{i\frac{2\pi}{\lambda}nl} e^{-\frac{\alpha l}{2}} \begin{pmatrix} \cosh(\frac{\eta}{4} + i\theta) & i \sinh(\frac{\eta}{4} + i\theta) \\ -i \sinh(\frac{\eta}{4} + i\theta) & \cosh(\frac{\eta}{4} + i\theta) \end{pmatrix} \quad (2.26)$$

Description des Intensités lumineuses Nous avons déterminé toutes les matrices, nous pouvons donc maintenant écrire l'expression de l'intensité en sortie du système. Le dichroïsme circulaire et la rotation optique sont des grandeurs très inférieures à 1. De plus, nous prenons des mesures pour $X=\pi+x$ avec x très petit devant 1. Nous pouvons donc simplifier l'expression de $E_{sortant}$:

$$E_{sortant} = -Ae^{i\frac{2\pi}{\lambda}nl}e^{-\frac{\alpha l}{2}} \begin{pmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & ix \\ ix & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & -\theta + i\frac{\eta}{4} \\ \theta - i\eta & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} = -Ae^{i\frac{2\pi}{\lambda}nl}e^{-\frac{\alpha l}{2}} \begin{pmatrix} 0 \\ \theta + i(x - \frac{\eta}{4}) \end{pmatrix} \quad (2.27)$$

Pour calculer l'intensité lumineuse qui arrive sur le détecteur on prend le module au carré de cette expression :

$$I_{sortant} = |A|^2 e^{-\alpha l} \left[\theta^2 + \left(x - \frac{\eta}{4}\right)^2 \right] \quad (2.28)$$

On remarque qu'en absence d'échantillon, l'intensité sortante trace une parabole centrée en $x=0$. En effet, quand le déphasage est nul, le Babinet-Soleil n'a aucun effet sur l'onde qui le traverse. En présence d'échantillon, l'intensité forme une parabole centrée en $x = \frac{\eta}{4}$.

Dans le cas où l'échantillon a été excité par la pompe, il présente une variation de dichroïsme circulaire et d'absorption :

$$\alpha l = \alpha_0 l + \delta \alpha l \quad (2.29)$$

$$\eta = \eta_0 + \delta \eta \quad (2.30)$$

où α_0 et η_0 sont les valeurs de l'absorption et du dichroïsme circulaire statique et $\delta \alpha l$ et $\delta \eta$ sont les variations de ces grandeurs induites par l'excitation de la pompe. En l'absence de pompe, l'expression de l'intensité détectée est donnée par l'équation 2.28. Elle devient, après excitation (en considérant la rotation optique et ses variations indépendantes de x) :

$$I_{avec pompe} = |A|^2 e^{-\alpha l} e^{-\delta \alpha l} \left[K + \left(x - \frac{\eta + \delta \eta}{4}\right)^2 \right] \quad (2.31)$$

La nouvelle parabole est centrée en $\frac{\eta + \delta \eta}{4}$.

Nous allons voir dans le paragraphe suivant comment calculer le dichroïsme circulaire et ses variations à partir de ces différentes paraboles ainsi que la façon dont nous avons déterminé le signe du dichroïsme circulaire. En effet, les directions des axes extraordinaires des lames du Babinet-Soleil étant inconnues, nous ne pouvons pas connaître *a priori* le sens de variation de x quand l'épaisseur de la lame variable augmente.

Mesure du dichroïsme circulaire

Le programme d'acquisition mesure, pour chaque retard pompe-sonde, les paraboles $I_{sans pompe}$ et $I_{avec pompe}$ dont les expressions sont données par les équations 2.28 et 2.31. On rappelle l'intensité sans échantillon :

$$I_{sans echantillon} = |A|^2 x^2 \quad (2.32)$$

Signe du dichroïsme circulaire Nous connaissons l'expression de l'intensité en fonction du déphasage x introduit par le Babinet Soleil, cependant nous ignorons si ce déphasage croît ou décroît lorsque le programme d'acquisition déplace le prisme mobile. Le sens de variation de x en fonction du mouvement du prisme dépend des orientations des axes ordinaire et extraordinaire des deux lames de quartz. Or nous avons pu constater que cette orientation varie d'un Babinet Soleil à un autre (même s'ils sont fabriqués par le même fournisseur) et il n'y a pas de méthode simple pour déterminer cette orientation. Nous avons donc décidé de procéder à la mesure des paraboles $I_{\text{sans échantillon}}$ et $I_{\text{sans pompe}}$ avec un échantillon connu, à une longueur d'onde où celui-ci présente un fort dichroïsme circulaire sans ambiguïté de signe.

Ainsi le décalage entre la parabole $I_{\text{sans échantillon}}$ et la parabole $I_{\text{sans pompe}}$ nous permettra de savoir dans quel sens varie x sachant que $I_{\text{sans échantillon}}$ doit avoir son minimum en $x=0$ et $I_{\text{sans pompe}}$ doit avoir son minimum en $x = \frac{\eta}{4}$

Nous avons choisi de mesurer le dichroïsme circulaire dans la myoglobine avec une sonde de longueur d'onde $\lambda=220$ nm. A cette longueur d'onde la myoglobine, riche en hélices α , présente un fort dichroïsme circulaire négatif.

Les paraboles sont tracées par le programme en fonction du paramètre "Position BS" qui correspond à la position du moteur qui déplace le prisme mobile du Babinet-Soleil.

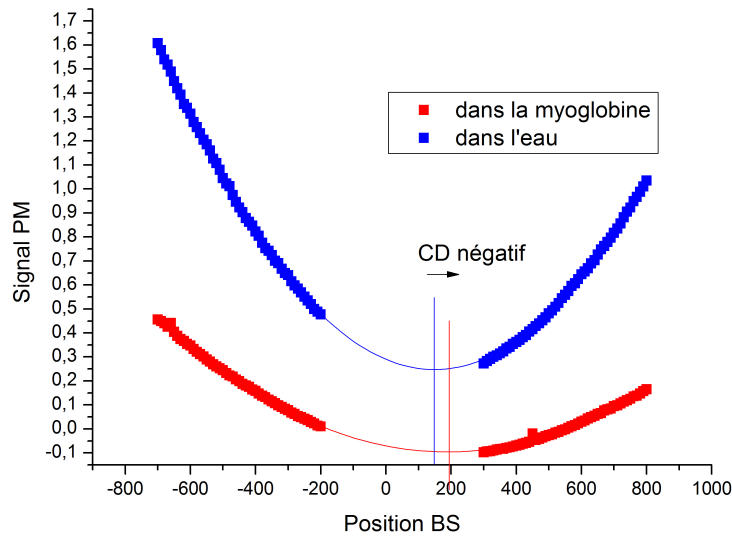


FIGURE 2.7 – Intensité en fonction de la position du prisme mobile du Babinet Soleil. En bleu la courbe obtenue avec une cuve de 1mm d'eau. En rouge la courbe obtenue avec une cuve d'1mm d'une solution de myoglobine. Les points autour du minimum de la parabole ne sont pas mesurés car ils sont trop bruités et n'apportent pas de précision pour l'ajustement.

On voit figure 2.7 que la parabole tracée pour la myoglobine est décalée vers la droite par rapport à la parabole tracée pour l'eau. Elle est donc centrée en une position du moteur proportionnelle à $-\frac{\eta}{4}$. Nous pouvons par conséquent en déduire que lorsque Position BS augmente le prisme se déplace dans le sens de x décroissant : $PositionBS = -ax$

Une variation positive du dichroïsme circulaire aura donc pour conséquence un décalage vers la gauche du minimum de la parabole tracée en fonction de Position BS.

Calcul de $\delta\eta$ et $\delta\alpha$ Le programme d'acquisition enregistre et calcule un ajustement des paraboles $I_{sans\ pompe}$ et $I_{avec\ pompe}$ sous la forme :

$$\begin{aligned} I_{sans\ pompe} &= A_s PositionBS^2 + B_s PositionBS + C_s \\ I_{avec\ pompe} &= A_a PositionBS^2 + B_a PositionBS + C_a \end{aligned} \quad (2.33)$$

Nous pouvons réécrire ces intensités en développant les équations 2.28 et 2.31 avec $PositionBS = -ax$:

$$\begin{aligned} I_{sans\ pompe} &= |A|^2 e^{-\alpha_0 l} \left(x^2 - x \frac{\eta}{2} + \frac{\eta^2}{16} + K \right) \\ &= |A|^2 e^{-\alpha_0 l} \left(\frac{PositionBS^2}{a^2} + \frac{PositionBS}{a} \frac{\eta}{2} + \frac{\eta^2}{16} \right) \\ I_{avec\ pompe} &= |A|^2 e^{-(\alpha_0 + \delta\alpha)l} \left(x^2 - x \frac{\eta + \delta\eta}{2} + \frac{(\eta + \delta\eta)^2}{16} + K \right) \\ &= |A|^2 e^{-(\alpha_0 + \delta\alpha)l} \left(\frac{PositionBS^2}{a^2} + \frac{PositionBS}{a} \frac{\eta + \delta\eta}{2} + \frac{(\eta + \delta\eta)^2}{16} + K \right) \end{aligned} \quad (2.34)$$

On peut ensuite identifier les coefficients de l'équation 2.33 à ceux de l'équation 2.34 :

$$\begin{aligned} A_s &= \frac{|A|^2}{a^2} e^{-\alpha_0 l} & B_s &= \frac{A_s}{a} \frac{\eta}{2} \\ A_a &= \frac{|A|^2}{a^2} e^{-(\alpha_0 + \delta\alpha)l} & B_a &= \frac{A_a}{a} \frac{\eta + \delta\eta}{2} \end{aligned} \quad (2.35)$$

Le programme calcule ensuite la variation de dichroïsme circulaire et la variation d'absorption à partir des coefficients des deux paraboles :

$$\begin{aligned} \delta\alpha l &= \ln\left(\frac{A_s}{A_a}\right) \\ \delta\eta &= 2\left(\frac{B_a}{A_a} - \frac{B_s}{A_s}\right) \end{aligned} \quad (2.36)$$

Les deux grandeurs $\delta\alpha l$ et $\delta\eta$ sont calculées pour chaque retard pompe sonde et on obtient ainsi une courbe donnant la dynamique de dichroïsme circulaire et d'absorption après l'excitation. Pour obtenir la valeur du CD correspondant à $(\alpha_g - \alpha_d)l$ il faut multiplier le résultat donné par le calcul ci-dessus par $2.5 \cdot 10^{-4}$.

2.3.3 Limitations de la méthode

La principale limitation de cette méthode de mesure est d'ordre temporel. L'acquisition d'une parabole complète prend plusieurs minutes, et il faut en mesurer deux (avec et sans pompe) pour pouvoir accéder à la variation de dichroïsme circulaire.

Ce temps d'acquisition élevé a pour conséquence que, lors d'une expérience pompe-sonde, on ne prend pas beaucoup de points de mesure, et qu'on ne peut pas beaucoup moyenner.

Ainsi les courbes obtenues sont souvent très bruitées et il faut mesurer de très forts changements de CD pour voir quelque chose.

2.4 Conclusion

Ainsi, le choix de l'une ou l'autre méthode de mesure du dichroïsme circulaire est intimement lié à la nature de l'excitation et de la sonde pour chaque expérience.

Dans toutes les expériences impliquant un T-jump il n'y a aucune interaction entre l'impulsion pompe et la molécule ce qui implique l'absence d'artefacts dûs à la polarisation imparfaite de la sonde : on peut donc utiliser la cellule de Pockels.

De la même façon, dans l'étude de la Bacteriorhodopsine, la pompe initie le photocycle en excitant le rétinale, tandis que la sonde interagit avec la structure secondaire de la protéine dans sa globalité : la cellule de Pockels convient dans cette expérience.

Au contraire, dans l'expérience concernant la PYP la sonde et la pompe interagissent toutes deux avec le chromophore de la protéine. Pour ne pas avoir d'artefacts de polarisation il faut soit que pompe et sonde soient polarisées linéairement selon le même axe ; soit que la sonde soit parfaitement circulaire. C'est pourquoi l'utilisation du compensateur de Babinet-Soleil, précédé d'un polariseur commun à la pompe et la sonde, est indispensable ici.

Nous verrons en détail dans chaque partie comment est mise en œuvre la mesure résolue en temps.

Deuxième partie

Dynamique de dépliement de polypeptides après un saut de température

Chapitre 3

Principe et étalonnage de l'expérience

3.1 L'expérience pompe-sonde

3.1.1 Description de l'expérience

Pour effectuer la mesure de dichroïsme circulaire résolu en temps après un saut de température, nous avons effectué une expérience pompe sonde.

Pour cette expérience nous disposons de deux lasers :

- Un laser Titane Saphir femtoseconde à 80 MHz
- Un laser Neodyme Yag à 20 Hz

Nous détaillerons dans les paragraphes suivants comment nous pouvons obtenir à partir de ces deux lasers une impulsion pompe à 1500 nm et une impulsion sonde accordable entre 200 et 220 nm.

La figure 3.1 représente le montage expérimental.

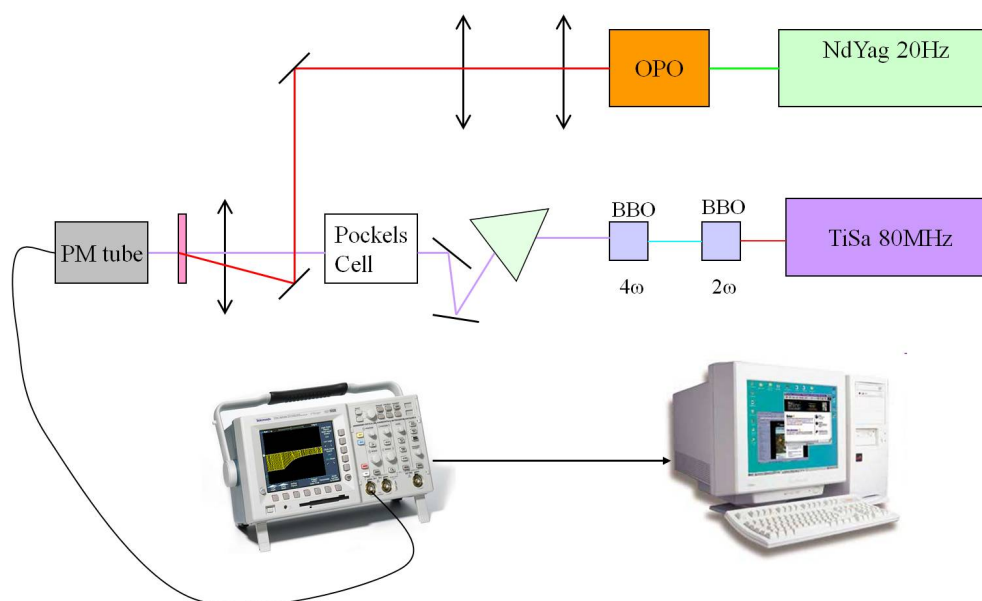


FIGURE 3.1 – Schéma du montage expérimental pour la mesure de la dynamique de dépliement de protéines après un saut de température

La pompe et la sonde sont superposées au niveau de l'échantillon. Pour effectuer l'alignement

nous utilisons un trou calibré de $50\mu\text{m}$ de diamètre placé au même endroit que la cuve contenant la solution de protéines.

Grâce à un photomultiplicateur, on envoie le signal UV sortant de la cuve vers un oscilloscope. La fréquence des impulsions sonde étant de 80 MHz (donc une période de 12 ns), et les constantes de temps des phénomènes observés étant de l'ordre de la centaine de nanosecondes au minimum, nous n'agissons pas sur le délai entre la pompe et la sonde pour effectuer la mesure : l'évolution de l'intensité de la sonde après le saut de température est directement lue et enregistrée par l'oscilloscope. Le choix de la sensibilité temporelle de l'appareil permet de déterminer l'échelle de temps que l'on souhaite observer.

Un programme informatique dirige à la fois la tension d'alimentation de la cellule de Pockels et l'enregistrement sur l'oscilloscope. Comme vous l'avez vu plus tôt, selon le signe de la tension d'alimentation, la cellule de Pockels permet de générer des ondes circulaires droite ou gauche.

Le programme informatique donne des instructions à l'oscilloscope afin de moyenniser dans deux mémoires différentes les signaux correspondant à chacune de ces polarisations. Après avoir moyenné, les traces des signaux en mémoire dans l'oscilloscope sont enregistrées dans deux fichiers différents correspondant aux deux polarisations.

On peut ensuite calculer le dichroïsme circulaire ainsi que son évolution temporelle à partir de ces deux fichiers de données.

3.1.2 Obtention du saut de température

Méthodes

Il existe deux méthodes pour effectuer le chauffage d'une solution par une impulsion laser : le chauffage direct et le chauffage indirect. Le chauffage direct consiste à éclairer la solution à l'aide d'une impulsion laser infrarouge excitant un mode de vibration de l'eau autour de 1500 cm^{-1} .

Le chauffage indirect consiste à placer dans la solution un colorant qui va absorber l'impulsion laser et dont la désexcitation provoque l'échauffement des molécules d'eau qui l'entourent[18][19]. Cela permet de pouvoir utiliser un laser visible (NdYAG par exemple avec le Basic Red comme colorant)

Cette dernière méthode présente plusieurs inconvénients :

- On ne sait pas si la présence du colorant va affecter la protéine
- Le colorant peut s'agréger, créant des sites de nucléation pour l'apparition de bulles au moment du T-jump
- La taille du saut de température dépend du rendement de l'absorption par le colorant, or celui-ci peut finir par photoblanchir

Une pompe dans l'infra-rouge

Afin de transformer les impulsions à 532 nm en impulsions infra rouge nous utilisons un Oscillateur Paramétrique Optique (OPO). Nous allons en expliquer rapidement le principe[20].

Lorsqu'une onde lumineuse de pulsation ω , appelée pompe, est envoyée sur un cristal non linéaire,

celui-ci génère deux ondes de pulsation ω_1 et ω_2 telles que $\omega = \omega_1 + \omega_2$ avec une condition d'accord de phase entre ces trois ondes.

Si dans ces conditions, l'onde de pulsation ω_1 par exemple est envoyée à travers le cristal alors cette onde est amplifiée au cours de la traversée : c'est le phénomène d'amplification paramétrique optique. Le cristal illuminé par l'onde de pulsation ω devient un milieu amplificateur pour les ondes ω_1 et ω_2 .

Alors si l'on place ce cristal amplificateur dans une cavité optique, les ondes de pulsation ω_1 et ω_2 peuvent atteindre de grandes intensités selon la configuration de la cavité. Cette méthode de l'OPO est utilisée couramment pour obtenir des impulsions accordables dans l'infra rouge.

En effet, les valeurs des pulsations générées dépendent de l'orientation du cristal par rapport à la pompe et à la cavité (condition d'accord de phase).

Afin de se placer au maximum d'absorption de l'eau nous avons mesuré le coefficient d'absorption en fonction de la longueur d'onde de l'idler (voir 3.2).

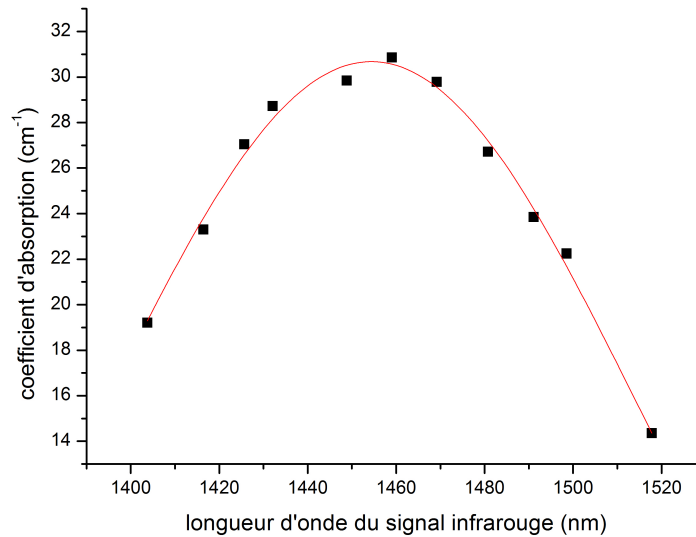


FIGURE 3.2 – Coefficient d'absorption de l'eau en fonction de la longueur d'onde de l'idler

Ne disposant pas d'un spectrophotomètre fonctionnant dans l'infra-rouge, nous avons mesuré la longueur d'onde du signal complémentaire pour accorder l'OPO afin que le faisceau infra-rouge ait la longueur d'onde désirée de 1454 nm.

Dans notre OPO, le faisceau du laser Neodyme Yag à 532 nm est donc finalement séparé en un faisceau signal à 839nm et un faisceau complémentaire à 1454 nm correspondant au maximum d'absorption de l'eau que nous avons mesuré.

3.1.3 Génération de la sonde UV

Pour générer le faisceau sonde dans l'UV, nous disposons d'un laser titane saphir accordable entre 800 et 880 nm. Les impulsions de ce laser sont envoyées à travers deux cristaux de BBO de type I ¹

1. Le doublage de fréquence est dit de type I dans deux cas de figure, selon que le cristal a une biréfringence positive ou négative : le faisceau incident est orienté suivant l'axe ordinaire et le second harmonique est généré parallèlement

doubleurs de fréquence successifs[20].

Le laser titane saphir émet un faisceau dont la polarisation est verticale. Ce faisceau est focalisé avec une lentille sur un premier cristal de BBO.

Le premier cristal de BBO a une épaisseur de 1mm. Sa face d'entrée est taillée à 29° de l'axe extraordinaire. Ce cristal est monté avec son axe ordinaire vertical sur un support qui peut être tourné autour de cet axe afin d'ajuster l'angle entre le faisceau incident et l'axe extraordinaire. Ce premier étage permet de passer d'environ 800 nm à 400 nm. Le faisceau doublé bleu a une polarisation horizontale à la sortie du cristal.

Un filtre supprime le faisceau rouge résiduel, et une lentille focalise le faisceau sur le deuxième cristal.

Le second cristal a une épaisseur de 3 mm. Sa face d'entrée est taillée à 75° de l'axe extraordinaire. Le cristal est monté avec son axe ordinaire horizontal sur un support qui peut être tourné autour de cet axe pour ajuster l'angle d'incidence du faisceau. Ce second étage permet d'atteindre les longueurs d'ondes UV entre 205 et 230 nm. Le faisceau UV obtenu a à nouveau une polarisation verticale.

Les deux cristaux peuvent aussi être déplacés parallèlement à la direction de propagation pour ajuster la focalisation du faisceau.

L'accordabilité de ce montage est limitée à 205 nm car en dessous de cette longueur d'onde il n'existe pas d'angle d'incidence possible pour doubler le faisceau bleu (angle supérieur à 90°). Nous présentons dans le tableau 3.1 les angles des deux étages permettant d'obtenir différentes longueurs d'onde UV.

Longueur d'onde incidente (nm)	Angle 1 ^{er} BBO	Angle 2 nd BBO
920	25.6	60.6
900	26.1	63.3
880	26.7	66.6
860	27.3	70.6
840	27.9	76.0
820	28.5	87.3
800	29.2	impossible

TABLE 3.1 – Angles d'incidence permettant le quadruplement de fréquence à différentes longueurs d'ondes en degrés.

3.1.4 Taille des faisceaux

Pour que la sonde voie, lors de sa traversée de la cuve, une température uniforme, il est nécessaire que celle-ci ait un diamètre plus petit que le faisceau pompe (figure 3.3).

Nous avons mesuré la taille des faisceaux pompe et sonde à l'aide d'un trou calibré à $50\text{ }\mu\text{m}$ monté sur un support à déplacement micrométrique. Pour connaître la taille exacte des faisceaux

à l'axe extraordinaire ou inversement, le faisceau incident est parallèle à l'axe extraordinaire et l'harmonique généré suivant l'axe ordinaire.

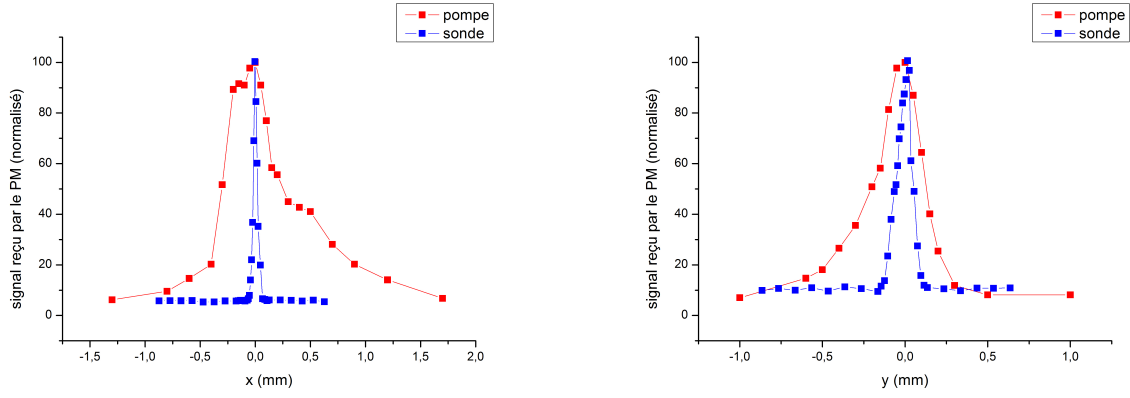


FIGURE 3.3 – Mesure de la taille des faisceaux pompe et sonde suivant les directions perpendiculaires à la propagation au niveau du point focal

nous devons déconvoluer les courbes obtenues d'avec la forme du trou.

Pour ce faire, écrivons l'intensité transmise par le trou en fonction de la coordonnée x selon laquelle on déplace le trou en supposant que l'intensité du faisceau est de forme gaussienne :

$$I_{\text{faisceau}}(x) = I_0 + A \exp\left(-\frac{(x - x_0)^2}{2w_x^2}\right) \quad (3.1)$$

L'intensité transmise par un trou de diamètre D à la position x s'écrit :

$$I_{\text{transmis}}(x) = I_0 D + A \int_{x-\frac{D}{2}}^{x+\frac{D}{2}} \exp\left(-\frac{(u - x_0)^2}{2w_x^2}\right) du \quad (3.2)$$

C'est cette fonction que l'on mesure sur les courbes de la figure 3.3. Afin de pouvoir extraire la valeur de w_x il faut exprimer cette fonction de façon à ce qu'on puisse l'utiliser pour ajuster les courbes expérimentales.

Ceci est possible grâce à la fonction erreur, qui est tabulée et enregistrée dans les logiciels de traitement de données :

$$\text{erf}(x) = \frac{1}{\sqrt{\pi}} \int_0^x \exp(-t^2) dt \quad (3.3)$$

Ainsi on peut écrire et ajuster l'intensité transmise par le trou :

$$I_{\text{transmis}}(x) = I_0 D + A w_x \sqrt{\frac{\pi}{2}} \left[\text{erf}\left(\frac{x + \frac{D}{2} - x_0}{\sqrt{2}w_x}\right) - \text{erf}\left(\frac{x - \frac{D}{2} - x_0}{\sqrt{2}w_x}\right) \right] \quad (3.4)$$

On trouve alors les largeurs à mi-hauteur des faisceaux pompe et sonde :

	Pompe	Sonde
FWHM _{x} en μm	490	30
FWHM _{y} en μm	290	103

TABLE 3.2 – Tailles des faisceaux pompe et sonde extraites de l'ajustement prenant en compte la taille du trou

Nous constatons que le faisceau sonde est comme désiré bien plus petit que le faisceau pompe.

3.2 Saut de température

Dans cette partie, nous allons exposer les deux méthodes que nous avons utilisées afin d'évaluer la dynamique de température dans la cuve lors de l'expérience pompe sonde. Nous avons dans un premier temps effectué des simulations mathématiques avec le logiciel de calcul Matlab pour connaître l'évolution de la température au cours d'un grand nombre d'expériences pompe-sonde. Mais ce qui nous intéresse le plus est le saut de température réel atteint lorsque l'on soumet la cuve à une impulsion pompe. Nous avons mesuré ce saut de température ainsi que sa dynamique sur différentes échelles de temps.

Pour commencer, il est possible d'évaluer le saut de température que nous allons obtenir par un calcul simple de thermodynamique[21].

On trouve les grandeurs physiques utiles au calcul dans le tableau 3.3.

Absorption à 1454nm	$\alpha = 32 \text{ cm}^{-1}$
Masse volumique à 25°C	$\rho = 0,99621 \text{ kg/L}$
Capacité thermique de l'eau à volume constant	$C_v = 4180 \text{ J.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$

TABLE 3.3 – Constantes physiques de l'eau

L'élévation de température peut s'écrire à partir de la variation d'énergie interne comme :

$$\Delta T = \frac{\Delta U}{\rho V C_V} \quad (3.5)$$

Quelle est la variation d'énergie interne du volume d'eau soumis au laser pompe ?

On approxime le volume d'eau chauffé à un cylindre de 0.5 mm de diamètre sur 1 mm de longueur soit $V = 0,196 \text{ mm}^3 = 0,196 \mu\text{L}$

Lors du passage de l'impulsion dans la cuve, celle ci est absorbée par l'eau. La variation d'énergie de l'impulsion s'écrit :

$$\Delta U_{impulsion} = E_0 e^{-\alpha l} - E_0 \quad (3.6)$$

où E_0 est l'énergie d'une impulsion du faisceau incident soit 6 mJ environ. Nous pouvons donc écrire la variation d'énergie de la solution :

$$\Delta U = E_0 (1 - e^{-\alpha l}) \quad (3.7)$$

D'où

$$\Delta T = \frac{E_0 (1 - e^{-\alpha l})}{\rho V C_V} = \frac{5.75 \cdot 10^{-3}}{8,2 \cdot 10^{-4}} = 7^\circ\text{C} \quad (3.8)$$

Paradoxalement, pour une cuve de 100 μm , même si l'énergie absorbée est réduite, le volume d'eau à chauffer étant divisé par 10 on obtient un saut de température plus important :

$$\Delta T = \frac{E_0(1 - e^{-\alpha l})}{\rho V C_V} = \frac{1.64 \cdot 10^{-3}}{8,2 \cdot 10^{-5}} = 20^\circ C \quad (3.9)$$

Nous voyons donc que l'épaisseur de la cuve a une importance capitale dans l'obtention d'un grand saut de température. Ce sera confirmé par les mesures que nous avons effectuées.

Les mesures montreront qu'on n'atteint pas expérimentalement de si grands sauts de température.

3.2.1 Simulations mathématiques de la température

Afin de connaître *a priori* la dynamique de la température dans notre cuve, nous avons écrit une simulation Matlab inspirée de celle écrite par Martin Volk (elle même issue de [22]). Cette simulation est basée sur le premier principe de la thermodynamique et la loi de Fourier pour le transfert thermique. Elle nous permet de voir l'échauffement global de la solution après de nombreuses impulsions pompe ainsi que la dynamique de la température juste après le saut de température

Principe du calcul

Pour le calcul, nous découpons la cuve en cellules élémentaires indicées *i* et *j* selon une symétrie cylindrique (figure 3.4).

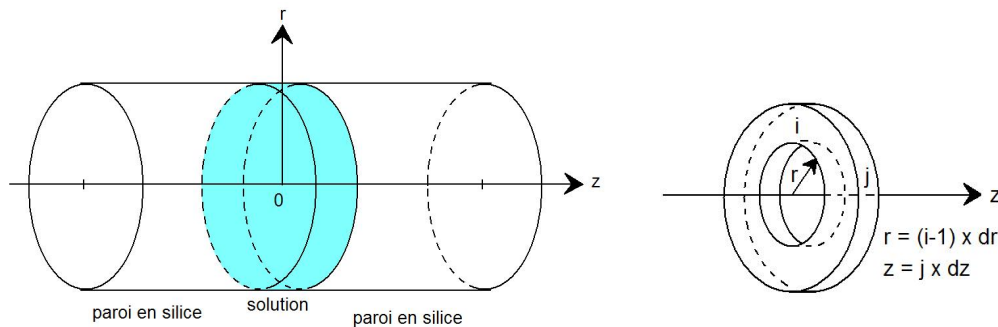


FIGURE 3.4 – Cuve en coordonnées cylindriques. Cellule élémentaire de calcul

Le programme effectue un calcul sur 3 matrices : températures, flux thermiques suivant *r* et flux thermiques suivant *z*. Pour calculer l'évolution de la température, la structure du programme est la suivante :

Tant que le temps n'est pas égal à la durée de la simulation

On initialise les températures :

$T = T$ à la fin de la boucle + T due au T-Jump

Tant qu'il ne s'est pas écoulé le temps entre deux impulsions pompe

Le programme calcule les flux

Le programme calcule les températures

Le programme incrémente le temps

Nous allons maintenant écrire les équations qui régissent les flux et les températures. Elles sont issues de la loi de Fourier sur le transfert thermique et du premier principe de la thermodynamique[21].

Loi de Fourier :

$$\vec{j} = -\lambda \overrightarrow{\text{grad}T} = -\lambda \left(\frac{\partial T}{\partial r} \vec{e}_r + \frac{\partial T}{\partial z} \vec{e}_z \right) \quad (3.10)$$

Le flux d'énergie thermique suivant r de la cellule i à la cellule i+1 pendant dt est :

$$Q_{\text{radial}_{i,j}} = \vec{j} \cdot dS \vec{e}_r dt = -\lambda 2\pi i dr dz dt \frac{(T_{i+1,j} - T_{i,j})}{dr} \quad (3.11)$$

Le flux d'énergie thermique suivant z de la cellule j à la cellule j+1 pendant dt est :

$$Q_{\text{axial}_{i,j}} = \vec{j} \cdot dS \vec{e}_z dt = -\lambda \pi (2i - 1) dr^2 dt \frac{T_{i,j+1} - T_{i,j}}{dz} \quad (3.12)$$

Premier principe de la thermodynamique :

$dU = C_v dT = \delta Q$ d'où $dT = \frac{\delta Q}{C_v}$ avec C_v la capacité calorifique à volume constant de la cellule. Celle-ci est égale à la capacité calorifique volumique multipliée par le volume de la cellule soit : $C_v = C_{v_{\text{vol}}} \pi (2i - 1) dr^2 dz$

Dans la boucle, on remplace la température par sa nouvelle valeur :

$$T_{i,j} = T_{i,j} + \frac{Q_{\text{radial}_{i-1,j}} + Q_{\text{axial}_{i,j-1}} - Q_{\text{radial}_{i,j}} - Q_{\text{axial}_{i,j}}}{C_{v_{\text{vol}}} \pi (2i - 1) dr^2 dz} \quad (3.13)$$

A chaque fois que le temps est un multiple de la période de la pompe, la température est augmentée :

$$T_{i,j} = T_{i,j} + \Delta T e^{-\ln(2) \frac{(i-1)dr^2}{(\frac{FWHM}{2})^2}} e^{-\alpha j dz} \quad (3.14)$$

Pour que le calcul soit correct il faut prêter une attention particulière à la taille des cellules élémentaires et à la durée du pas de calcul. Lors de mes premières simulations je n'avais pas prêté attention à ce problème et j'observais des résultats complètement divergents. En effet il faut utiliser des cellules assez petites, surtout aux interfaces entre la cuve et la solution.

Résultats de la simulation

Nous étudions le saut de température dans de l'eau. La cuve thermostatée que nous utilisons est constituée de silice ordinaire. Les grandeurs thermodynamiques utiles sont regroupées dans le tableau 3.4

	Conductivité thermique λ ($W.K^{-1}.m^{-1}$)	Capacité thermique volumique ($J.m^{-3}.K^{-1}$)
Eau	$589.4.10^{-3}$	$4,14.10^6$
Silice	1.4	$1.4.10^6$

TABLE 3.4 – Constantes thermodynamiques de l'eau et de la silice à 20°C

Les simulations sont faites avec un saut de 5°C car cela correspond à l'ordre de grandeur obtenu

expérimentalement.

Température après le saut Pour connaître la dynamique de la température après une seule impulsion pompe, les paramètres suivants sont utilisés pour la simulation :

- largeur à mi-hauteur : $500\ \mu\text{m}$
- épaisseur de la paroi de silice : $0,5\ \text{mm}$
- épaisseur de la solution $100\ \mu\text{m}$
- température de départ : 20°C
- saut de température : 5°C
- $dr = 5\ \mu\text{m}$
- $dz = 1\ \mu\text{m}$
- $dt = 0.2\ \mu\text{s}$

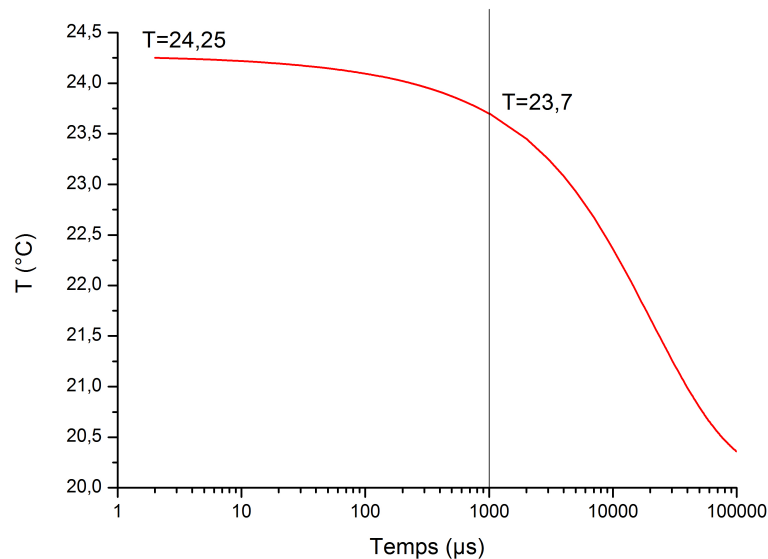


FIGURE 3.5 – Température au centre du faisceau pompe moyennée sur la longueur de la cuve. A cause de l'absorption la température moyenne est inférieure à 25°C .

Cette simulation nous permet de connaître jusqu'à quelle échelle de temps il nous sera possible de faire des mesures de variation de dichroïsme circulaire. Il faut que la température varie peu sur l'échelle de temps de la dynamique moléculaire observée pour que les changements de dichroïsme circulaire puissent être imputés sans équivoque à un changement de structure.

La figure 3.5 représente l'évolution de la température de l'eau après l'absorption d'une impulsion pompe en fonction du temps. On peut constater qu'en une milliseconde, la température moyennée sur la longueur de la cuve subit une diminution de $0,5^\circ\text{C}$ soit 10% de l'amplitude du saut. Il faut donc que nous étudions des dynamiques moléculaires dont la constante de temps est inférieure à la milliseconde. S'il nous fallait étudier des phénomènes dont la durée approche la milliseconde nous devrions corriger les résultats en tenant compte du refroidissement.

Accumulation de température Nous calculons dans ce paragraphe la température au cours d'une série d'impulsions pompe. Dans un premier temps nous utilisons un laser de pompe à 30 Hz, puis celui-ci étant endommagé nous l'avons remplacé par un laser à 20 Hz. La figure 3.6 montre l'évolution de la température de la cuve pour ces deux fréquences de pompe.

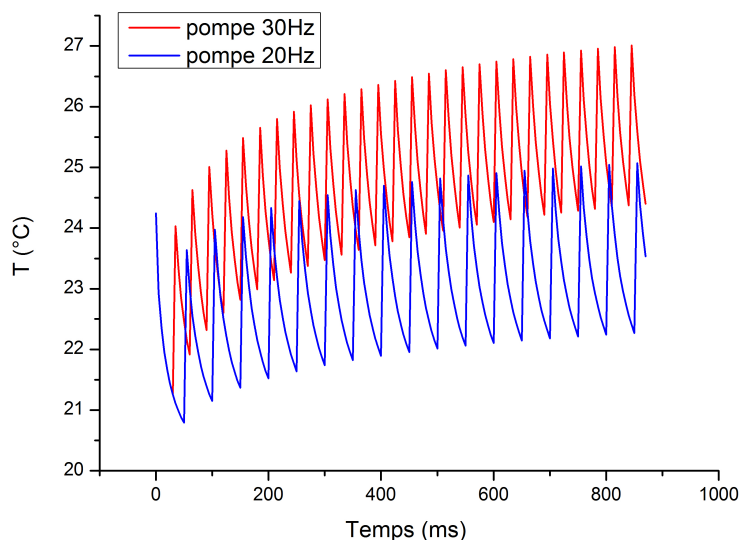


FIGURE 3.6 – Température au centre du faisceau pompe moyennée sur la longueur de la cuve soumise à une série d'impulsions pompe. En rouge la pompe à 30 Hz, en bleu la pompe à 20 Hz

Ce qui saute d'abord aux yeux est la forte augmentation de la température plancher au cours du temps (figure 3.6). Cet effet d'accumulation de température est dommageable pour notre expérience car nous désirons pouvoir connaître la température initiale de la cuve en nous référant à notre thermostat. Cette accumulation de température implique une grande incertitude sur les conditions de l'expérience. Nous verrons dans le paragraphe suivant comment résoudre ce problème grâce au mouvement de la cuve.

Nous observons aussi que la température plancher est plus faible avec la pompe à 20 Hz. Ce fait est tout à fait logique : plus la fréquence est faible, plus la solution a de temps pour refroidir entre deux impulsions pompe.

3.2.2 Mesure expérimentale de la température

Afin de pouvoir évaluer la température dans notre solution nous avons dû trouver un échantillon dont l'absorption variait de façon importante avec la température. Nous avons choisi d'utiliser un indicateur coloré de pH placé dans un tampon dépendant de la température.

Le tampon trishydroxyméthylaminométhane

Le trishydroxyméthylaminométhane ou Tris (3.7) est un tampon acide-base dont le pK_a vaut 8.06 à 25°C. Cela signifie qu'il peut être utilisé pour fabriquer des solutions tampon entre $pH=7.1$ et $pH=9$. Nous avons choisi ce tampon car son pK_a dépend fortement de la température (ce qui est habituellement un inconvénient pour les expérimentateurs). Le pH du tampon Tris que nous préparons varie de -0.03 par degré celsius.

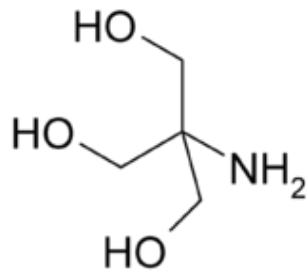


FIGURE 3.7 – Tampon Tris

Pour préparer 10 mL d'une solution de $pH \in [6, 7.6]$ à température ambiante nous procédons de la manière suivante :

- dissoudre 0.12 g de Tris dans 7 mL d'eau
- ajouter goutte à goutte de l'acide chlorhydrique à 1 mol.L^{-1} en mesurant le pH pour s'approcher de la zone de virage de l'indicateur coloré (voir plus loin)
- ajouter de l'eau pour ajuster le volume à 10 mL

Le bleu de bromothymol

Le bleu de bromothymol (BBT) est un indicateur coloré de pH très couramment utilisé (figure 3.8) en travaux pratiques dans l'enseignement secondaire et supérieur. Nous l'avons choisi car sa zone de virage coïncide avec la zone de pH dans laquelle le tampon Tris est efficace.

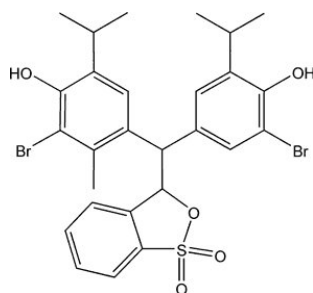


FIGURE 3.8 – Bleu de bromothymol

Sa forme acide jaune et sa forme basique bleue ont deux spectres d'absorption très différents. La transition entre les deux formes se fait entre $pH=6$ et $pH=7.6$ (zone appelée zone de virage). Dans cette zone, une petite variation de pH entraîne une forte variation du spectre d'absorption.

Etalonnage de l'échantillon

En ajoutant deux pointes de spatule de Bleu de Bromothymol à la solution de tampon Tris, nous obtenons une solution dont le spectre d'absorption dépend fortement de la température. Nous avons obtenu des spectres d'absorption du BBT en fonction de la température en plaçant le BBT dans une cuve thermostatée de longueur $100 \mu\text{m}$ (figure 3.9). Les mesures sont faites entre 20°C et 40°C environ tous les 2° .

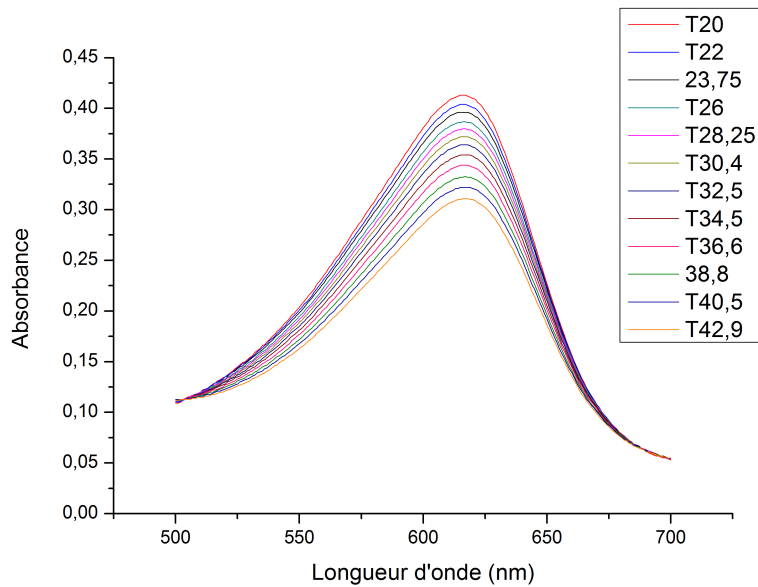


FIGURE 3.9 – Spectres d'absorption du BBT dans le tampon Tris en fonction de la température

Pour mesurer le saut de température dans notre expérience pompe sonde, nous disposons d'un laser Helium Néon à 632 nm. Ainsi nous pouvons visualiser directement sur l'oscilloscope la dynamique du saut de température.

Afin de déduire la variation de température du changement d'intensité reçue par le photomultiplicateur, on trace l'Absorbance en fonction de la température à 632 nm (figure 3.10). Le saut de température s'écrit alors, en fonction de la pente de la droite obtenue :

$$\Delta T = \frac{-\log\left(\frac{I_{\text{après le saut}}}{I_{\text{avant le saut}}}\right)}{\frac{dA}{dT}} \quad (3.15)$$

La valeur de la pente de la droite représentant l'absorbance en fonction de la température est : $-3,7 \cdot 10^{-3} \text{ degrés}^{-1}$.

Nous pouvons maintenant mesurer la dynamique du saut de température.

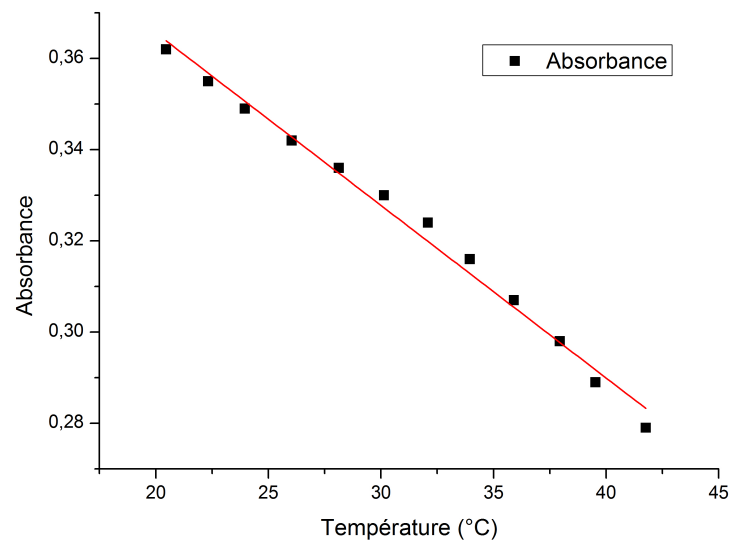


FIGURE 3.10 – Absorbance de la solution de BBT à 632 nm en fonction de la température. En rouge l’ajustement linéaire de la droite.

Dynamique du saut de température

Dans cette partie nous devons nous intéresser à deux aspects de la dynamique de température dans la cuve. Tout d’abord, nous devons nous assurer qu’après un saut de température, la température dans la cuve reste constante sur une échelle de temps nous permettant de faire nos mesures. Ensuite, nous devons nous assurer qu’entre deux impulsions pompe, la température est revenue à sa valeur initiale.

Température juste après le saut Nous avons vérifié que la température restait constante après le saut sur une échelle de temps permettant d’effectuer nos mesures.

Pour cette mesure, le balayage de l’oscilloscope est de $100 \mu\text{s}$ par division. On mesure le signal sonde transmis à travers la cuve de BBT. Comme on peut le voir figure 3.11, après un saut de 10°C , la température varie peu sur 1ms après l’impulsion pompe. Nous pouvons donc mesurer confortablement des dynamiques de repliement dont les constantes de temps sont de plusieurs microsecondes sans devoir corriger les résultats vis-à-vis du refroidissement de la solution.

Accumulation de température Nous avons vu avec les simulations mathématiques que la température de fond de la solution augmente après un grand nombre d’impulsions pompe (voir figure 3.12). Ceci peut poser problème si nous voulons mesurer des dynamiques en fonction de la température du thermostat. Si la solution s’échauffe de manière incontrôlée nous ne sommes plus en mesure de savoir quelle est la température de départ de l’expérience.

Nous avons donc mesuré le saut de température en régime d’accumulation (voir figure 3.12) : dans cette expérience le saut de température est d’environ $3,5^\circ\text{C}$. Nous observons clairement sur la courbe de gauche que le signal plancher de la courbe rouge (pompe allumée) est plus élevé que le signal sans pompe de la courbe noire. La température plancher augmente avec l’accumulation des impulsions pompe.

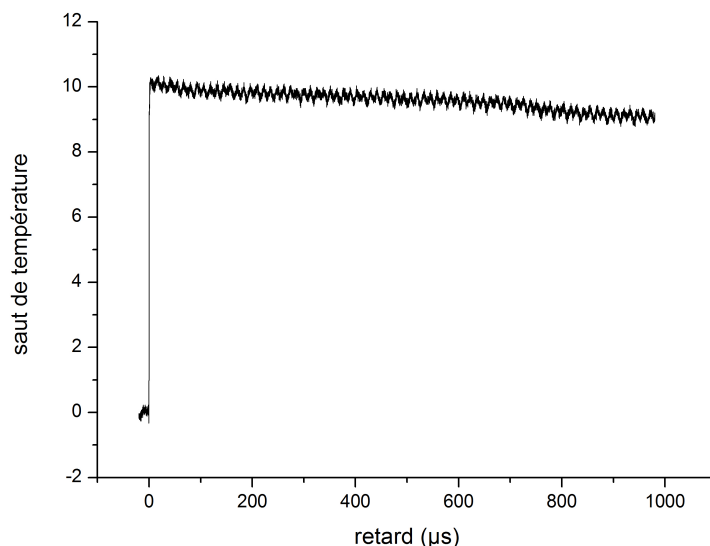


FIGURE 3.11 – Dynamique de la température après l'impulsion pompe. La mesure est faite dans une cuve de $100\ \mu\text{m}$ thermostatée à 21°C en rotation à $8\ \text{V}$ (voir plus loin)

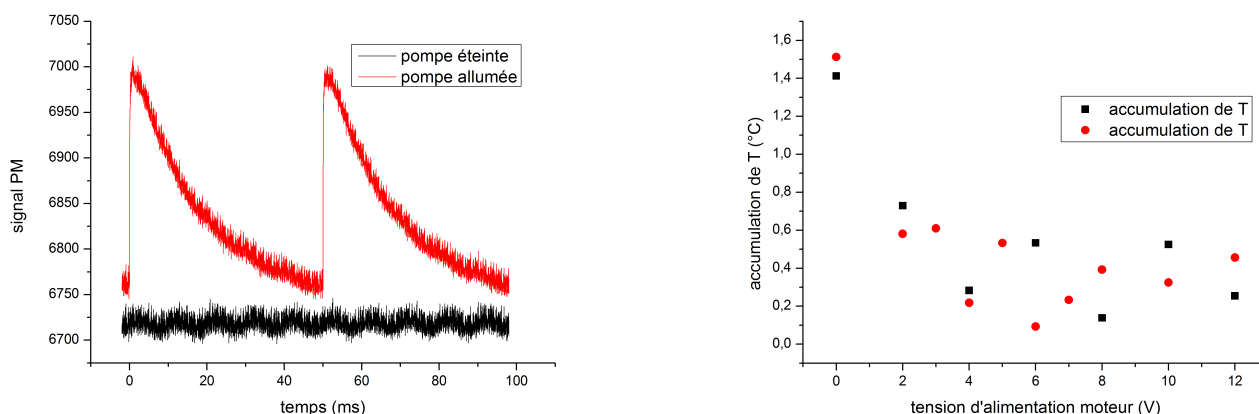


FIGURE 3.12 – A gauche : Visualisation de l'offset de température au cours de la mesure. On voit que le fond de la courbe correspondant à la cuve soumise à la pompe n'est pas égal au signal sans pompe. La cuve tourne avec une alimentation de $2\ \text{V}$. A droite : Offset de température en fonction de la tension d'alimentation du rotateur (2 séries de mesures). Mesure effectuée sur une cuve de $100\ \mu\text{m}$

Cependant, pour éviter la surexposition des protéines aux impulsions laser nous avons déjà prévu de faire bouger la cuve contenant la solution grâce à un rotateur. Ce mouvement s'avère aussi utile pour éviter l'échauffement de la solution. On voit sur la partie droite de la figure 3.12, représentant l'accumulation de température en fonction de la vitesse de rotation de la cuve, que, comme on peut s'y attendre, plus la rotation est rapide, moins la solution s'échauffe. Nous avons mesuré une vitesse de rotation de la cuve égale à 26 tours par minute par Volts.

Pour une cuve de $100\ \mu\text{m}$ et une tension d'alimentation supérieure à $6\ \text{V}$, soit $156\ \text{tr.min}^{-1}$ l'offset de température est noyé dans le bruit de la mesure. Cela signifie que la rotation est assez rapide pour que deux impulsions pompes successives ne se chevauchent pas spatialement et qu'un même point de la cuve a le temps de se refroidir avant d'être soumis à nouveau à une impulsion pompe. Nous nous

placerons donc dans cette configuration pour nos mesures.

Pour aller plus loin et corroborer les conclusions précédentes nous pouvons vérifier que deux impulsions pompe successives ne se chevauchent pas spatialement en regardant la dynamique de température entre deux impulsions pompe. Nous constatons figure 3.13 que la différence de température revient à zéro au bout de 50 ms.

Cette mesure permet aussi d'évaluer l'amplitude du saut de température que nous pouvons atteindre grâce à notre montage. Pour une puissance de pompe de 150mW soit 7,5 mJ par impulsion nous obtenons un saut d'environ 10°C, ce qui nous permet d'observer des dynamiques de grande amplitude.

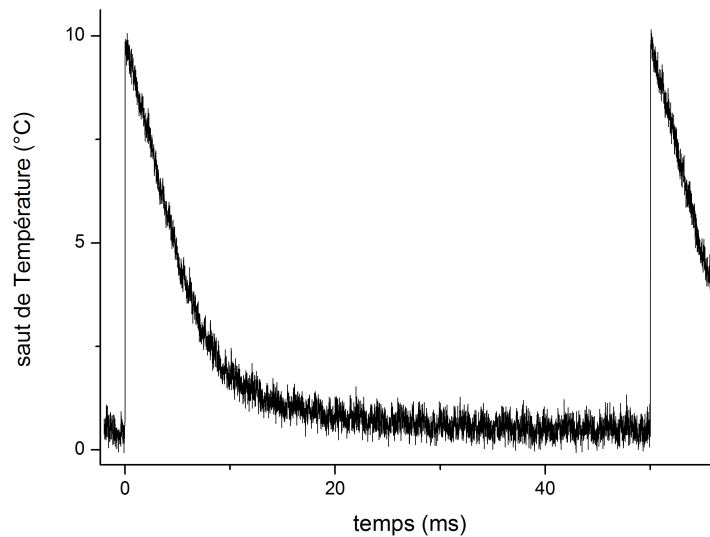


FIGURE 3.13 – Saut de température dans une cuve de 100 μ m. La tension d'alimentation du rotateur est de 6 V

Nous pouvons aussi vérifier que la rotation de la cuve n'influe pas outre mesure sur l'amplitude du saut de température.

Influence du thermostat La cuve utilisée pour la mesure du T-jump est thermostatée grâce à une circulation d'eau. Nous devons vérifier que la température du thermostat n'influe ni sur la dynamique ni sur l'amplitude du saut en température.

On peut voir sur la figure 3.14 que la taille du saut de température varie peu avec la température du thermostat. On peut attribuer la légère différence aux fluctuations de la pompe dont la puissance oscille entre 140 mW et 160 mW au cours du temps.

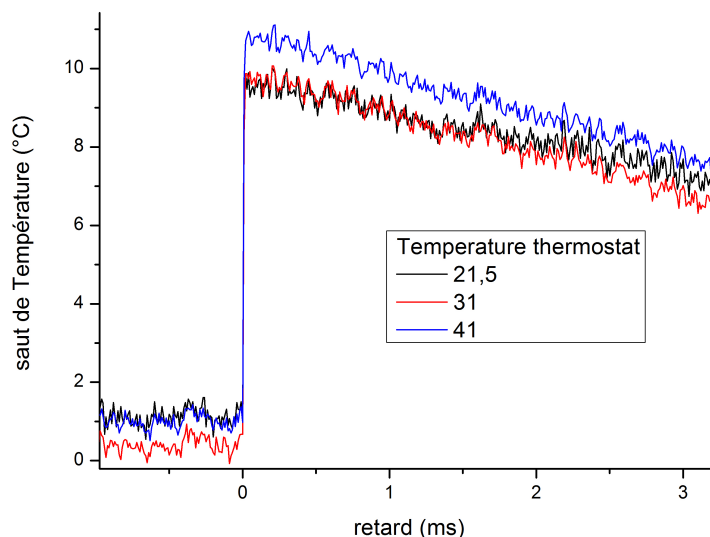


FIGURE 3.14 – Saut de température dans une cuve de 100 μm. La tension d'alimentation du rotateur est de 6 V

3.2.3 Le saut de température dans l'eau lourde

Pour l'étude du dépliement de l'acide polyglutamique nous avons effectué deux campagnes de mesures : une première avec le PGA dissout dans l'eau, une seconde dans l'eau lourde.

L'eau lourde est une molécule d'eau dans laquelle les atomes d'hydrogène sont remplacés par l'isotope Deuterium (qui contient un neutron et un proton).

Nous devons donc nous poser la question de savoir quelle est la taille du saut de température dans l'eau lourde, et si sa dynamique est la même que dans l'eau.

Propriétés thermodynamiques

Tout d'abord, si nous voulons effectuer un saut de température dans l'eau lourde, il nous faut savoir à quelle longueur d'onde doit se situer la pompe infrarouge pour être fortement absorbée. La mesure de l'absorbance d'une cuve remplie de D₂O en fonction de la longueur d'onde nous apprend que le maximum d'absorption se situe à 1950 nm.

Les capacités calorifiques de l'eau et de l'eau lourde diffèrent peu [23] :

H ₂ O	D ₂ O
4180 J.kg ⁻¹ .K ⁻¹	4620 J.kg ⁻¹ .K ⁻¹

Un même apport d'énergie générera donc un même saut de température dans les deux milieux. De la même façon les conductivités thermiques des deux milieux sont très proches :

H ₂ O	D ₂ O
0.589 W.K ⁻¹ .m ⁻¹	0.595 W.K ⁻¹ .m ⁻¹

Ainsi la dynamique de la température dans la cuve sera la même dans D₂O.

Nous pouvons donc avec confiance mesurer des temps de relaxation du dépliement dans D₂O et les comparer à ceux obtenus dans l'eau par la même méthode.

Evaluation du saut de température

Nous pouvons estimer le saut de température que nous pouvons obtenir dans D₂O grâce à notre montage.

Le réglage de l'OPA pour obtenir la longueur d'onde de 1950 nm nous mène à une impulsion de l'ordre de 4 mJ. le coefficient d'absorption de l'eau lourde est de 14 cm⁻¹. En effectuant le même calcul qu'au début de la partie 3.2 on obtient un saut de température de 6°C. Cependant nous savons que le saut de température estimé par ce calcul est fortement surestimé : pour l'eau le calcul donnait un saut de 20°C tandis qu'expérimentalement nous obtenons entre 2 et 8°C. Ainsi si l'on considère la même surévaluation pour le saut de température dans D₂O nous pouvons nous attendre à des sauts entre 0.5 et 2.5 degrés.

Ces estimations seront confirmées expérimentalement dans la partie suivante grâce à l'évaluation du saut de température à partir du changement de CD du PGA mesuré dans H₂O et D₂O.

3.2.4 Conclusion

Nous avons montré dans cette partie que notre montage expérimental nous permet d'obtenir un saut de température qui convient aux mesures que nous voulons effectuer.

Tout d'abord le saut est d'amplitude raisonnable : entre 2 et 8°C.

Ensuite la dynamique de refroidissement de la cuve, même en cas de rotation, est très lente par rapport aux phénomènes que nous souhaitons observer : ainsi nous ne serons pas gênés par le refroidissement.

Chapitre 4

Dynamique de dépliement de l'acide polyglutamique PGA

L'acide Polyglutamique ou PGA est un polypeptide constitué uniquement d'acide glutamique (figure 4.1). Cette molécule est utilisée comme système modèle pour l'étude de la transition entre hélice α et pelote statistique.

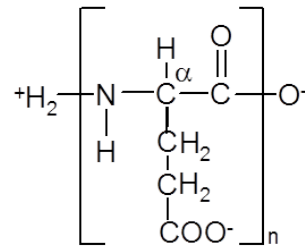


FIGURE 4.1 – Formule du PGA

L'hélicité du PGA dépend très fortement du pH de la solution dans laquelle il est dissout : en effet le repliement est facilité par la protonation du groupement acide carboxylique tandis que la forme ionique provoque une forte répulsion entre les résidus. A pH neutre la molécule est complètement dépliée. A $\text{pH} = 4.5$, le PGA est presque entièrement replié en hélice. Dès $\text{pH} = 5.1$, le polypeptide n'est plus replié qu'à 50%.

Pour étudier le dépliement du PGA il faut donc le placer dans une solution tampon au pH choisi pour que la molécule soit suffisamment repliée. Nous étudions la dynamique du dépliement pour un pH égal à 4.7 ajusté grâce à l'ajout d'acide chlorhydrique et de soude en petite quantité.

Nous avons choisi d'utiliser le PGA afin de valider notre méthode de mesure de la dynamique de repliement par dichroïsme circulaire. De plus, notre expérience peut permettre d'apporter des précisions sur l'hélicité du polypeptide au cours du temps, grandeur qui n'est pas accessible via les expériences faites avec une sonde infra rouge.

La fraction d'hélice f_h peut être déterminée à partir de la valeur du dichroïsme circulaire à 222 nm selon l'expression suivante [24] :

$$f_h = \frac{\theta_{222} - \theta_c}{\theta_h - \theta_c} \quad (4.1)$$

où θ_c et θ_h sont respectivement l'ellipticité de la pelote statistique et de l'état complètement replié en hélice.

Ces deux grandeurs dépendent de la température :

$$\theta_h = -44000 + 250T \text{ (pour une hélice de longueur infinie)} \quad (4.2)$$

$$\theta_c = 2220 - 53T \quad (4.3)$$

Pour convertir notre mesure de CD en ellipticité exprimée comme ici en $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ par résidu nous pouvons utiliser les expressions de la partie 1.4 et en déduire, en considérant une concentration de 18 mg.mL^{-1} soit 0.12 mol.L^{-1} en concentration de résidus : $\theta = 1,2.10^6 CD$.

Nous verrons aussi que nous pouvons extraire des expériences de T-jump des grandeurs thermodynamiques concernant l'équilibre entre le polypeptide replié et la pelote statistique.

L'expérience de saut de température sera aussi menée dans une solution de PGA dans l'eau lourde, afin de valider ou invalider les suppositions faites par les spectroscopistes infrarouge.

4.1 Spectres de CD du PGA

Avant de tenter d'élucider la dynamique de dépliement du PGA nous avons fait les mesures des spectres de CD en fonction de la température pour obtenir les courbes dites "de fusion" aux longueurs d'ondes qui nous intéressent.

La courbe de fusion issue de la mesure du CD à 220 nm nous permet d'accéder à la constante d'équilibre de la réaction de repliement. Cette courbe nous permet aussi d'évaluer le saut de température, pour chaque mesure, grâce à la valeur du saut de CD observé.

4.1.1 Préparation de l'échantillon

Dans l'eau comme dans l'eau lourde, les pH et pD sont ajustés par ajout de très petites quantités de HCl (ou DCl) et de NaOH (ou NaOD). Nous avons vérifié (voir conclusion de l'annexe B) que ces infimes concentrations d'ions Na^+ et Cl^- ont une absorption négligeable à 220 nm.

Dans l'eau

Des échantillons sont préparés régulièrement de la façon suivante : on dissout 20 mg de PGA dans 1 mL d'eau. Le pH est ensuite ajusté à 4.7 par ajouts de petites quantités de HCl et de NaOH.

Au final nous avons obtenu des échantillons de concentration entre 17 et 18 mg.mL^{-1} avec des pH entre 4.66 et 4.7.

Dans l'eau lourde

Nous avons préparé régulièrement des échantillons en dissolvant 10 mg de PGA dans 0.5 mL de D₂O. Le pD est ajusté à la valeur voulue par ajouts de petites quantités de DCl et NaOD.

Rappelons qu'avec un pH mètre classique, on lit un pH* qui correspond au pD par la relation [25] :

$$pD = pH^* + 0.4 \quad (4.4)$$

Ainsi nous ajustons le pH lu à 4.3, pour que le pD soit égal à 4.7. Nous avons obtenu des échantillons de concentration entre 15 et 18 mg.mL⁻¹ avec des pD entre 4.65 et 4.8.

Remarque : il semble qu'avec de la poudre de PGA neuve, les échantillons de PGA dans D₂O sont très instables et deviennent troubles après une journée même sans être soumis au T-jump. Nous interprétons ce phénomène comme une agrégation des hélices entre elles. Cela a nécessité la préparation d'une solution chaque jour de mesure.

4.1.2 Spectres de CD

Grâce à notre spectrophotomètre à dichroïsme circulaire (voir Annexe A), nous avons mesuré les spectres de CD en fonction de la température pour le PGA dans l'eau et le PGA dans l'eau lourde.

CD du PGA dans l'eau

Nous avons mesuré à quatre reprises les variations du spectre de CD du PGA dans l'eau avec la température. Les deux dernières courbes sont les mieux définies, elles serviront à la suite de l'exploitation.

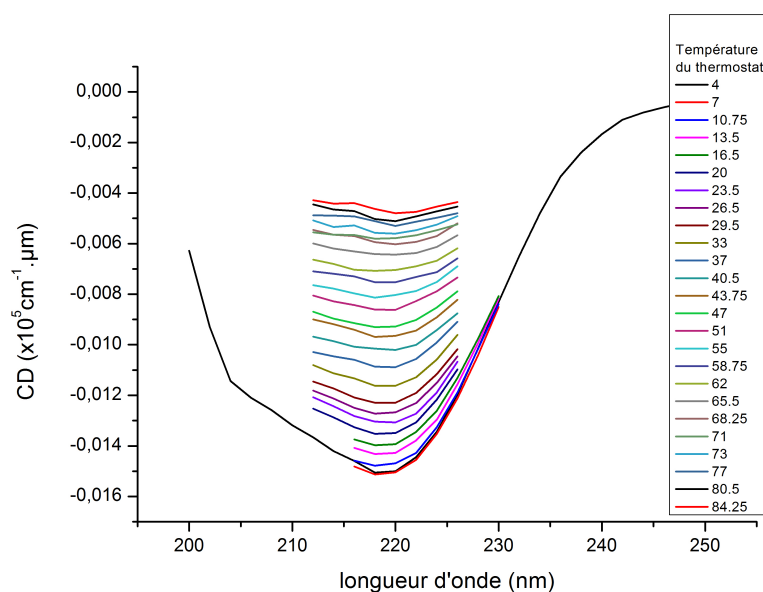


FIGURE 4.2 – Spectres de dichroïsme circulaire du PGA dans l'eau en fonction de la température obtenus avec notre CD-spectrophotomètre. La température indiquée est celle du bain thermostatique.

On peut voir figure 4.2 un exemple de spectres obtenus. Grâce à cette mesure nous avons accès à la courbe de fusion du PGA dans l'eau et aux paramètres thermodynamiques de la réaction de

repliement.

CD du PGA dans l'eau lourde

Nous avons mesuré à deux reprises les variations du spectre de CD du PGA dans l'eau lourde avec la température.

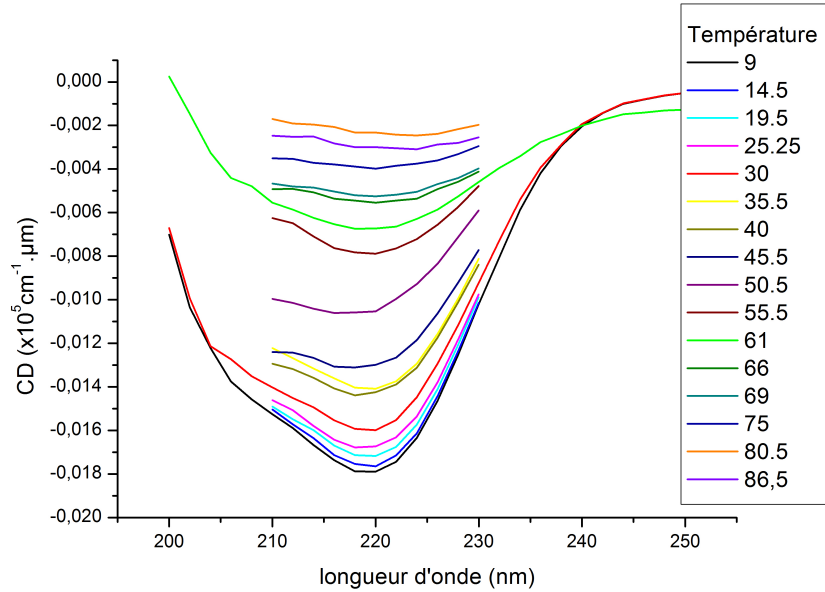


FIGURE 4.3 – Spectres de dichroïsme circulaire du PGA dans l'eau lourde en fonction de la température obtenus avec notre CD-spectrophotomètre. La température indiquée est celle du bain thermostatique.

On trouve figure 4.3 les spectres obtenus. Grâce à cette mesure nous pourrions par la suite calculer la constante d'équilibre du repliement.

4.2 Exploitation thermodynamique des courbes de fusion

Afin de connaître la constante d'équilibre de la "réaction" de repliement : $PGA_{déplié} \rightleftharpoons PGA_{replié}$ nous avons effectué un ajustement global des courbes de CD et de leurs dérivées en fonction de la température.

4.2.1 Méthode

Ajustement des courbes de fusion

La méthode d'exploitation des courbes de fusion est issue de l'article de C. Krejtschi et K. Hauser[26][27, 28].

L'absorbance, le dichroïsme circulaire ou la position d'une bande d'absorption peuvent être décrits, en fonction de la température, par une fonction de la forme :

$$y(T) = (Y_1 + m_1.T) + (Y_2 + m_2.T) \cdot \frac{K_{eq}(T)}{1 + K_{eq}(T)} \quad (4.5)$$

Où $K_{eq}(T)$ est la constante d'équilibre de la réaction de dépliement et s'écrit :

$$K_{eq}(T) = \exp\left(-\frac{\Delta G^0(T)}{R.T}\right) \quad (4.6)$$

et

$$\Delta G^0(T) = \Delta H_m + \Delta C_m.(T - T_m) - T.\left(\frac{\Delta H_m}{T_m} + \Delta C_m.\ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right) \quad (4.7)$$

où $\Delta G^0(T)$ est l'énergie libre de réaction en conditions standard, $R=8.314 \text{ J.K}^{-1}$ est la constante des gaz parfaits, T la température absolue.

T_m est la température de transition, ΔH_m est la variation d'enthalpie, et ΔC_m est la variation de capacité calorifique à $T=T_m$.

L'ajustement de cette seule courbe de fusion peut amener à de grandes variations dans l'évaluation des paramètres thermodynamiques, c'est pourquoi il est préférable d'ajuster aussi la dérivée :

$$\frac{dy}{dT}(T) = m_1 + \frac{m_2.(K_{eq}(T) + K_{eq}(T)^2) + (Y_2 + m_2.T).\frac{dK_{eq}}{dT}(T)}{(1 + K_{eq})^2} \quad (4.8)$$

avec

$$\frac{dK_{eq}}{dT}(T) = \left(\frac{\Delta C_m}{R.T} + \frac{\Delta H_m - \Delta C_m.T_m}{R.T^2}\right).K_{eq}(T) \quad (4.9)$$

Pour chaque échantillon nous avons ajusté les 2 courbes $CD(T)$ et les 2 courbes $\frac{dCD}{dT}(T)$ avec le logiciel IGOR pro 6.31(Wavemetrics). Les paramètres $\Delta H_m, \Delta C_m$ et T_m sont en commun pour les 4 courbes. Les paramètres Y_1, Y_2, m_1 et m_2 sont communs respectivement pour chaque mesure distincte du CD.

Allure des courbes de fusion

Dans ce paragraphe nous allons tenter d'élucider l'influence des différents paramètres thermodynamiques $\Delta H_m, \Delta C_m$ et T_m sur la forme de la courbe de fusion.

Dans ces simulations nous fixerons les paramètres Y_1, m_1, Y_2 et m_2 .

Influence de ΔH_m :

ΔC_m et T_m sont fixés à $-150 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ et 320 K .

On peut constater figure 4.4 que la valeur de ΔH_m tout autre paramètre fixé par ailleurs a une grande influence sur la visibilité de la forme sigmoïdale de la courbe. A grande enthalpie de réaction, la sigmoïde est très marquée, tandis qu'à faible enthalpie on la voit à peine. Il faut retenir cette observation pour la suite.

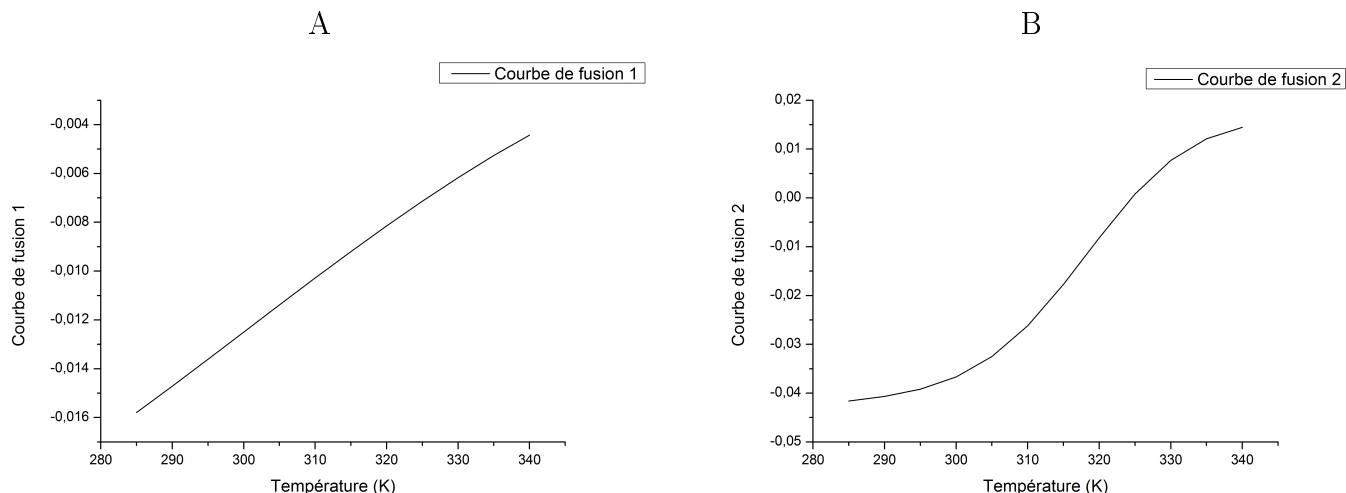


FIGURE 4.4 – A) Courbe de fusion avec $\Delta H_m = -15 \text{ kJ.mol}^{-1}$. B) Courbe de fusion avec $\Delta H_m = -100 \text{ kJ.mol}^{-1}$

Influence de ΔC_m :

Pour une valeur élevée de l'enthalpie de réaction $\Delta H_m = -100 \text{ kJ.mol}^{-1}$ la valeur de ΔC_m semble avoir peu d'influence sur l'allure de la courbe de fusion.

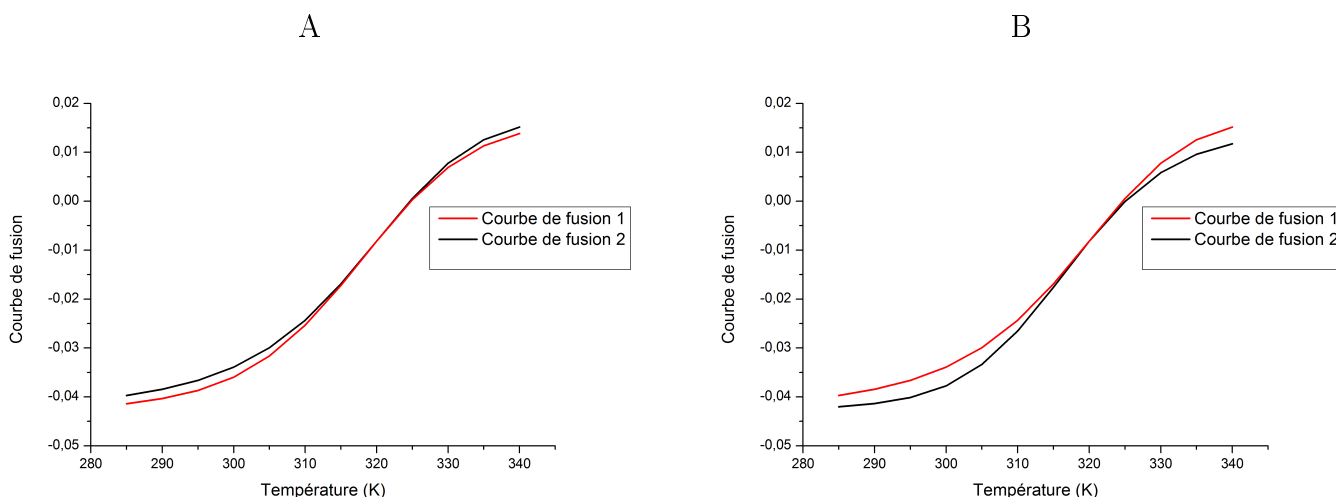


FIGURE 4.5 – A) La courbe de fusion 1 correspond à $\Delta C_m = -150 \text{ J.mol}^{-1}.K^{-1}$. La courbe de fusion 2 correspond à $\Delta C_m = -1500 \text{ J.mol}^{-1}.K^{-1}$ B) La Courbe de fusion 1 correspond à $\Delta C_m = -1500 \text{ J.mol}^{-1}.K^{-1}$. La courbe de fusion 2 à $\Delta C_m = +1500 \text{ J.mol}^{-1}.K^{-1}$

Que l'on multiplie ΔC_m par 10 (voir figure 4.5 A) ou que l'on en change le signe (voir figure 4.5 B), dans la limite de valeurs raisonnable permettant de conserver la forme sigmoïdale, on voit que l'allure de la courbe change très peu. Le changement de valeur se traduit par un décalage vers le haut ou vers le bas, qui lors d'un ajustement par la fonction décrivant la fusion, sera corrigé par le changement des paramètres Y_1 , m_1 , Y_2 et m_2 . Ainsi il est difficile d'obtenir une valeur de ΔC_m qui ait un sens.

Cependant, si cette grandeur n'influe par beaucoup sur la courbe de fusion, elle n'influe pas non plus sur la constante d'équilibre de la réaction de repliement dont la courbe de fusion est l'expression directe, ce qui n'entachera pas trop les résultats concernant les temps de dépliement et de repliement.

Quand on fait varier trop violemment ΔC_m , la courbe n'est plus du tout sigmoïdale, cela n'a plus

de sens. Cet effet est plus important à faible enthalpie de réaction. Ainsi nous savons que pour une courbe de fusion dont la sigmoïde est peu marquée, ΔC_m est forcément petite (de l'ordre de $100 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$).

Influence de T_m :

Si l'on fixe $\Delta H_m = -100 \text{ kJ.mol}^{-1}$ et $\Delta C_m = -150 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ on peut voir figure 4.6 que l'influence de la température de transition est très visible sur la courbe de fusion, et encore mieux sur sa dérivée. En effet cette température T_m correspond au changement de concavité de la courbe de fusion.

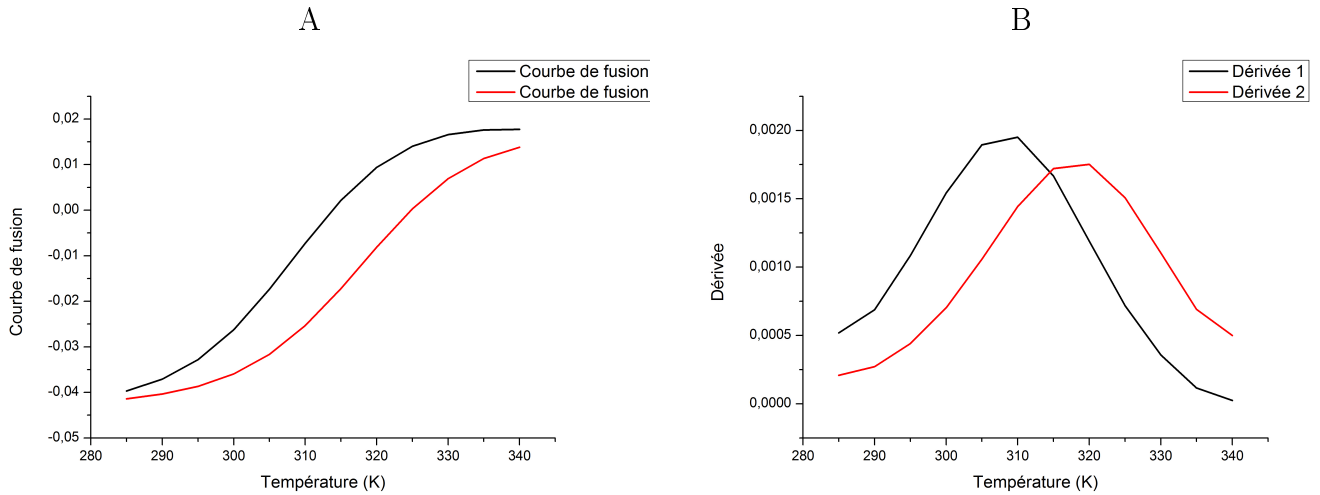


FIGURE 4.6 – A) Courbes de fusion avec $T_m=310 \text{ K}$ pour la courbe noire et 320 K pour la courbe rouge B) Dérivées des courbes de fusion. On fixe $\Delta H_m = -100 \text{ kJ.mol}^{-1}$ et $\Delta C_m = -150 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ pour les deux courbes.

Par contre, si l'on fixe $\Delta H_m = -15 \text{ kJ.mol}^{-1}$ avec la même valeur de ΔC_m il est beaucoup plus difficile de voir dans la figure 4.7 un décalage de la dérivée vu que le changement de concavité n'est pas marqué.

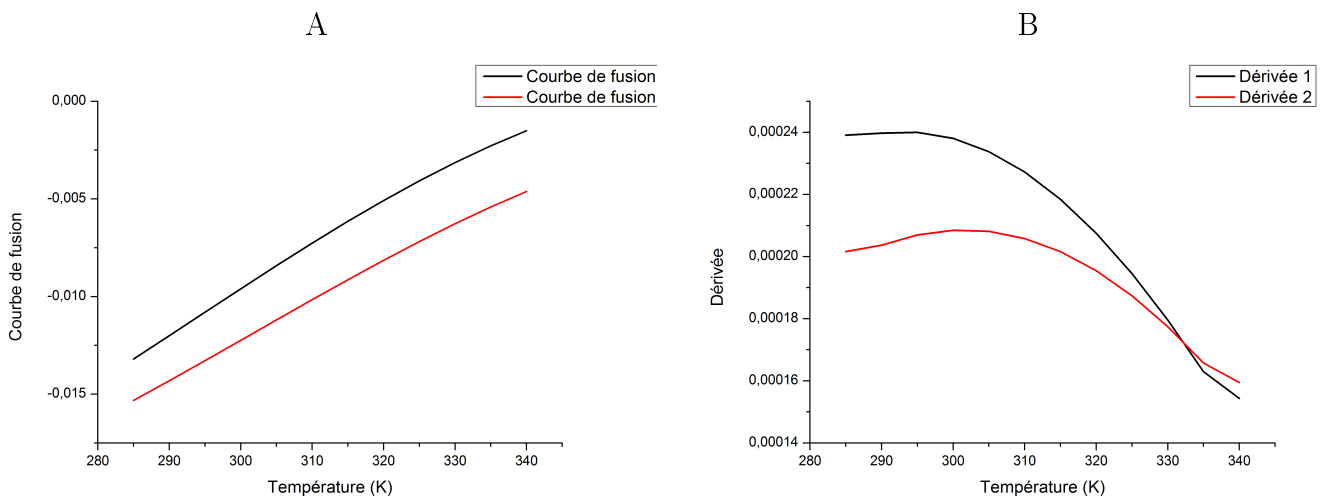


FIGURE 4.7 – A) Courbes de fusion avec $T_m=310 \text{ K}$ pour la courbe noire et 320 K pour la courbe rouge B) Dérivées des courbes de fusion. On fixe $\Delta H_m = -15 \text{ kJ.mol}^{-1}$ et $\Delta C_m = -150 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ pour les deux courbes.

Conclusion Dans tous les tests précédents, les paramètres Y_1 , m_1 , Y_2 et m_2 étaient fixés, mais lors de l'ajustement d'une courbe ces paramètres vont varier de même que les paramètres thermodynamiques. Ainsi même si nous avons vu des différences dans les courbes de fusion selon les valeurs des grandeurs thermodynamiques, il ne sera pas toujours aisé d'ajuster les courbes expérimentales.

Nous pouvons retenir que l'ajustement sera d'autant plus difficile que la sigmoïde sera peu marquée. Cependant nous savons maintenant qu'une sigmoïde peu marquée est le témoin d'une enthalpie de réaction très faible.

Adaptation de la méthode d'exploitation

Les courbes de fusion que nous obtenons expérimentalement sont difficiles à ajuster par les fonctions données partie 4.2.1 car elles sont bruitées et parfois on ne voit pas du tout la forme sigmoïdale.

Comme nous avons montré que la valeur de ΔC_m était très difficile à extraire de l'ajustement, et n'avait pas beaucoup d'influence sur la forme de la courbe, nous allons simplifier l'expression de la constante de réaction afin de diminuer le nombre de paramètres d'ajustement :

$$K_{eq} = \exp\left(-\frac{A(T - T_m)}{RT}\right) \quad (4.10)$$

Nous conservons le fait que l'enthalpie libre de réaction doit être nulle à $T = T_m$ et négligeons la partie logarithmique de son expression (voir équation 4.7).

Cette expression de K_{eq} impose que le coefficient A doit être supérieur à 0 car K_{eq} étant la constante de la réaction de repliement elle doit décroître avec la température.

Les equations 4.5 et 4.8 sont conservées.

Les paramètres d'ajustement seront donc réduits à A , T_m , Y_1 , m_1 , Y_2 et m_2 .

4.2.2 Résultats dans l'eau lourde

Grâce au logiciel Igor Pro nous avons effectué l'ajustement de nos deux courbes de CD en fonction de la température ainsi que leurs dérivées comme expliqué dans le paragraphe précédent. On trouve les résultats dans la figure 4.8.

L'ajustement converge vers les paramètres donnés dans le tableau 4.1. Il est à noter que l'ajustement peut aussi converger vers une valeur négative de A , mais cette valeur est à éliminer, comme expliqué précédemment.

A	$333 \pm 5 J.mol^{-1}.K^{-1}$
T_m	$324 \pm 5 K$

TABLE 4.1 – Paramètres de l'ajustement des courbes de fusion du PGA dans D2O

Nous pouvons donc pour chaque température calculer la constante d'équilibre en utilisant les équations 4.10 et 4.7.

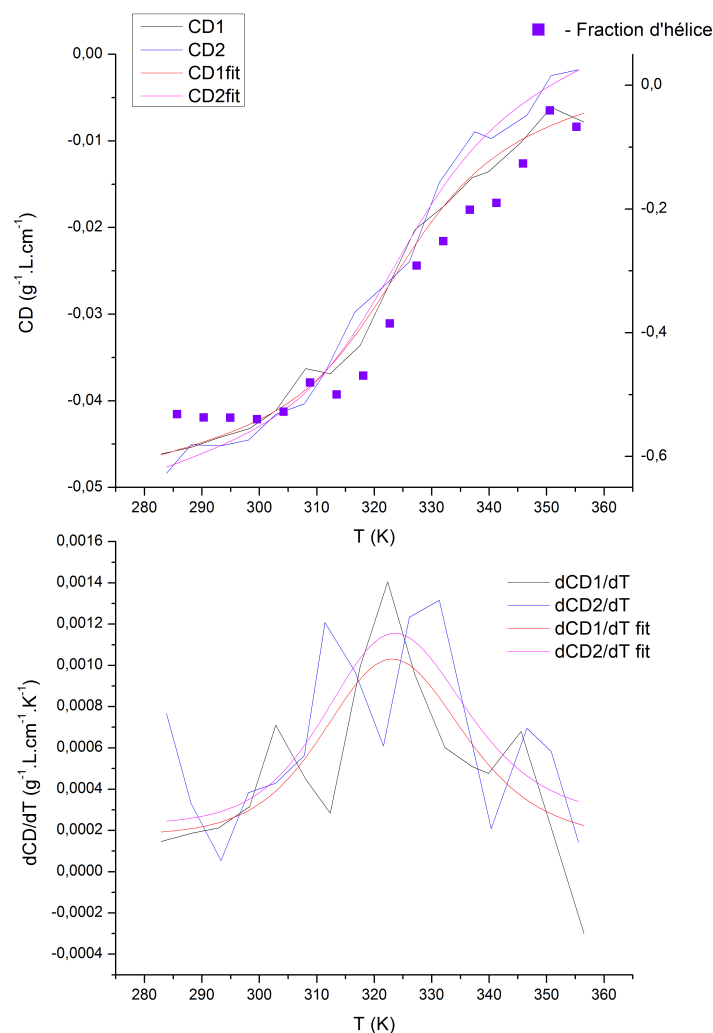


FIGURE 4.8 – De haut en bas : CD en fonction de la température et l'ajustement avec $y(T)$ à 220 nm et fraction d'hélice calculée avec l'équation 4.1. Dérivée du CD en fonction de la température et son ajustement avec $\frac{dy}{dT}$. Les courbes issues d'une première mesure sont en noir, leurs ajustements en rouge et résidus en rouge et noir. Les courbes issues de la seconde mesure sont en bleu, leurs ajustements en rose.

4.2.3 Résultats dans l'eau

Nous présentons figure 4.9 deux des courbes de fusion obtenues pour le PGA dans l'eau ainsi que leurs dérivées. Nous constatons tout de suite que la sigmoïde est très peu marquée, ce qui implique une enthalpie de réaction très faible comme évalué dans la partie 4.2.1. De plus l'allure très plate de ces courbes entraîne une impossibilité à faire converger l'ajustement sous Igor.

Les courbes de dérivées du CD sont terriblement larges et la détermination d'une température de transition est très aléatoire.

En testant différentes façons d'ajuster sous Igor Pro, en utilisant une, deux ou quatre courbes de fusion ensemble, nous trouvons une certaine dispersion des valeurs des paramètres A et T_m pour lesquels l'ajustement est correct.

Nous pouvons alors déduire une valeur moyenne et une incertitude sur les paramètres obtenus. Ces résultats sont regroupés dans le tableau 4.2

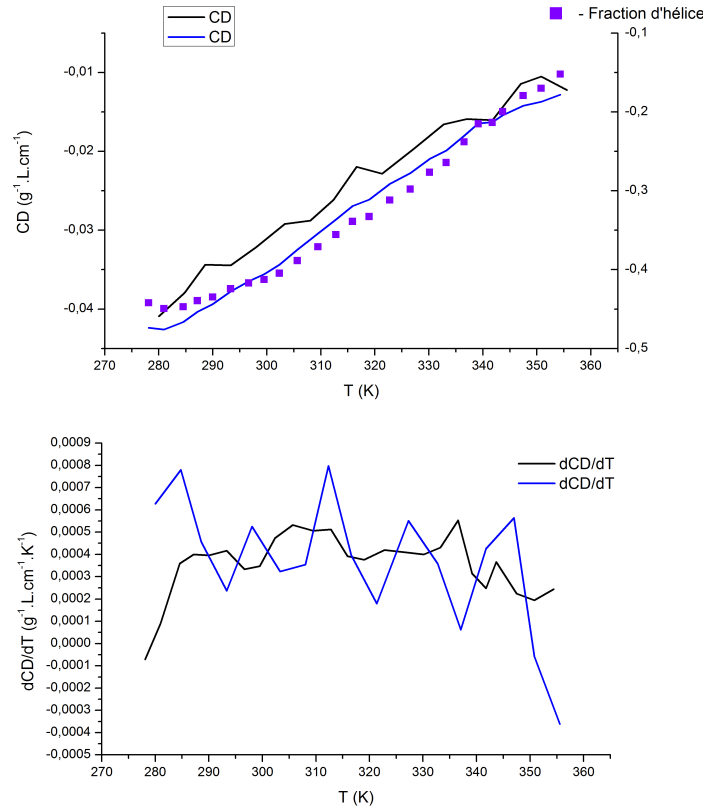


FIGURE 4.9 – En haut : CD du PGA dans l'eau en fonction de la température à 220 nm et fraction d'hélice calculée avec 4.1. En bas : dérivée du CD.

A	$53 \pm 20 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$
T_m	$331 \pm 10 \text{ K}$

TABLE 4.2 – Valeurs retenues pour les paramètres d'ajustement des courbes de fusion du PGA dans l'eau.

4.3 Dépliement du PGA dans l'eau

4.3.1 Détails expérimentaux

Nous avons effectué les expériences de mesure de la variation de dichroïsme circulaire et d'absorbance après un saut de température pour différentes températures de départ. Le saut de température varie d'une expérience à l'autre selon la puissance de la pompe et l'alignement pompe/sonde. On peut le calculer à partir de la variation de CD et des spectres de CD en fonction de la température.

Chaque courbe correspond à une moyenne de 512 mesures par l'oscilloscope, accumulées 10 fois. On moyenne ensuite sur 7 fichiers de données obtenus de cette façon. Chaque mesure correspond donc à la moyenne de 35840 sauts de température. Cette accumulation de mesures prend environ 1h30.

L'oscilloscope est réglé de façon à ce qu'une courbe représente une durée de 10 microsecondes. Le signal de trigger envoyé par le laser pompe est positionné à 15 % de l'échelle temporelle totale soit à

1.5 μs . Nous avons vérifié à quel moment la pompe arrive effectivement sur l'échantillon : elle arrive 450 ns avant le signal de trigger, soit au temps $t=1.05 \mu\text{s}$. Cet instant est défini comme le zéro de l'échelle de temps sur nos courbes.

La variation d'absorbance est calculée comme :

$$dA = -\log\left(\frac{I}{\text{moyenne de } I \text{ avant le saut}}\right) \quad (4.11)$$

On rappelle l'expression du dichroïsme circulaire dans cette mesure :

$$CD = (\alpha_L - \alpha_R)l = \frac{I_R - I_L}{\frac{I_R + I_L}{2}} \quad (4.12)$$

On calcule ensuite la variation de CD comme :

$$dCD = CD - \text{moyenne du CD avant le saut} \quad (4.13)$$

Dans notre exploitation des signaux enregistrés dans l'ordinateur, nous ne savons pas quel fichier correspond à l'onde circulaire droite ou à l'onde circulaire gauche. Nous savons que le CD du PGA à 220 nm est négatif et que sa valeur absolue diminue avec la température. Les courbes que nous avons tracées nous donnent alors la valeur absolue du CD du PGA puisqu'on y observe une baisse du CD au cours du temps et nous savons que le PGA se déplie quand la température augmente.

Le laser fluctuant sur des temps de l'ordre de la minute, nous ne sommes pas en mesure de déterminer la valeur de départ du dichroïsme circulaire. Cependant, la dynamique de repliement ayant lieu sur quelques microsecondes, sa mesure n'est pas affectée par ces fluctuations. Nous pouvons avec confiance mesurer la variation du dichroïsme circulaire sur cette échelle de temps. Pour connaître la valeur de départ nous nous référerons aux spectres de CD mesurés à différentes températures.

4.3.2 Allure et méthode d'exploitation des courbes

Nous avons réalisé le saut de température dans le PGA avec des températures de départ s'échelonnant de 15 à 46°C tous les 5 degrés environ.

Allure des courbes

Les courbes d'absorbance en fonction du temps sont affectées par des distorsions électroniques dues à un problème de masse entre le photomultiplicateur et le laser de pompe. De plus, selon les conditions de l'expérience telles que l'alignement sur le détecteur, la longueur d'onde sonde ou la température de départ, on observe un fort saut d'absorption positif ou négatif. (voir figure 4.10).

Les distorsions électroniques disparaissent sur les courbes de dichroïsme circulaire (voir figure 4.11) car le CD est obtenu par soustraction des signaux correspondant aux polarisations droite et gauche. De même, quel que soit le signe du changement d'absorption, on observe toujours un saut de CD négatif.

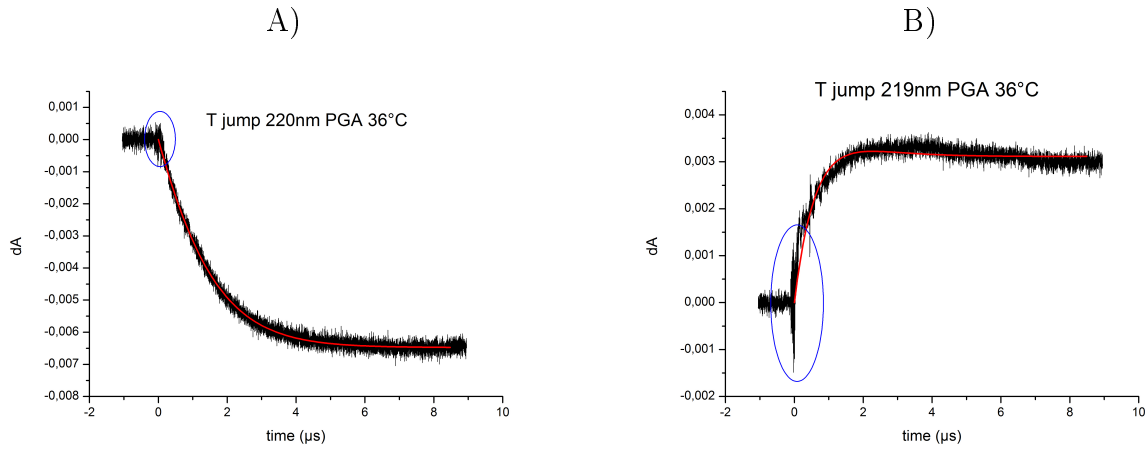


FIGURE 4.10 – Variation d'absorbance au cours d'un saut de température à partir de 36°C dans le PGA observé à A) 220 nm et B) 219 nm. Dans le cercle bleu on distingue les distorsions électroniques. La courbe noire est le signal brut, la courbe rouge l'ajustement par la fonction 4.17

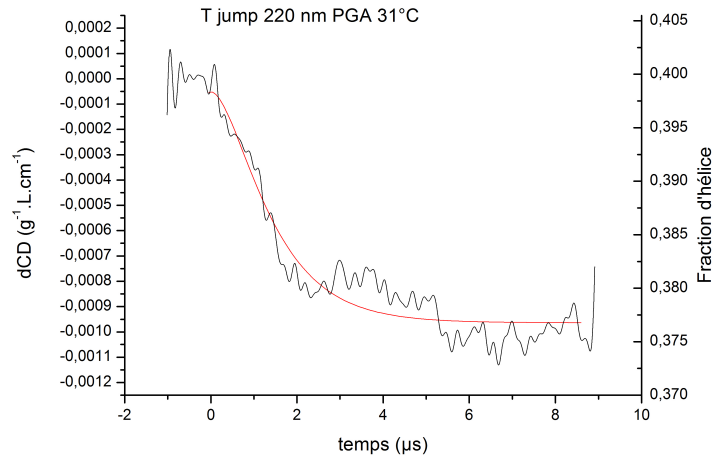


FIGURE 4.11 – Variation du dichroïsme circulaire et de la fraction d'hélice au cours d'un saut de température de 31°C à 35°C dans le PGA observé à 220 nm. En rouge l'ajustement.

Les constantes de temps calculées à partir des courbes de dichroïsme circulaire sont plus fiables que celles calculées à partir des courbes d'absorption. Cependant les courbes de dichroïsme circulaire sont parfois trop bruitées pour être exploitables.

Nous devons donc vérifier que les constantes de temps extraites des deux mesures sont comparables. Dans le cas où le dichroïsme circulaire ne permet pas d'extraire une constante de temps, nous nous fierons à celle donnée par l'absorption.

Nous remarquons figure 4.11 que le saut de température d'environ 4 degrés induit une diminution de la fraction d'hélice de seulement 2.5 %, ce qui est un très petit dépliement que nous mesurons ici aisément.

Extraction de la constante de temps

Le dichroïsme circulaire, même pour une hélice α comme le PGA, est un signal très petit et difficile à mesurer. Ses variations le sont d'autant plus.

Afin de minimiser le bruit et d'être en mesure de voir la variation de CD avec une durée d'acquisition raisonnable, nous avons été contraints de mettre une résistance de charge à l'entrée de l'oscilloscope. La présence de cette résistance affecte la réponse temporelle de l'oscilloscope et il faut en tenir compte.

Le PM est un générateur de courant, son branchement à l'entrée de l'oscilloscope est équivalent à un circuit RC (voir figure 4.12).

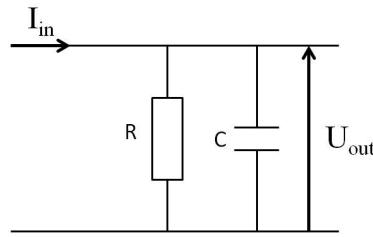


FIGURE 4.12 – Schéma du circuit RC à l'entrée de l'oscilloscope

L'équation qui relie I_{in} et U_{out} est la suivante :

$$I_{in} = \frac{U_{out}}{R} + C \frac{dU_{out}}{dt} \quad (4.14)$$

Grâce à nos observations des formes des courbes d'absorption nous avons déduit que la variation d'absorption ainsi que la variation de dichroïsme circulaire sont la combinaison d'un changement instantané (fonction de Heaviside d'amplitude 1) et d'une exponentielle décroissante.

$$I_{in}(t) = I_0 + H(t) \left[a + b(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \right] \quad (4.15)$$

La solution pour U_{out} est alors de la forme :

$$U_{out}(t) = R \left[(a + b)(1 - e^{-\frac{t}{RC}}) - b \frac{\tau}{RC - \tau} (e^{-\frac{t}{RC}} - e^{-\frac{t}{\tau}}) \right] \quad (4.16)$$

Si l'on connaît RC on peut donc ajuster les courbes avec cette fonction pour en déduire le temps de relaxation τ du déploiement.

On voit que le signal sera d'autant plus grand que la résistance d'entrée sera forte et ses variations sortiront d'autant mieux du bruit. Cependant, comme dA et dCD sont calculés via des quotients des valeurs de tension vues par l'oscilloscope, l'amplitude de ces grandeurs est indépendant de R et on ajuste nos courbes avec la fonction :

$$U_{out}(t) = (a + b)(1 - e^{-\frac{t}{RC}}) - b \frac{\tau}{RC - \tau} (e^{-\frac{t}{RC}} - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (4.17)$$

Nous avons testé différentes valeurs de résistance d'entrée R et avons choisi de travailler avec $R=10k\Omega$. Alors nous avons mesuré un $RC=1 \mu s$.

4.3.3 Résultats expérimentaux

Résultats bruts

Nous allons maintenant présenter les résultats bruts de nos expériences de saut de température dans le PGA.

Pour chaque température de départ, la variation d'absorbance, et la variation de CD quand c'était possible, ont été ajustées avec la méthode expliquée dans le paragraphe précédent.

La température finale est estimée à l'aide des spectres de CD en fonction de la température et de l'amplitude du saut de CD. Quand le saut de CD n'était pas visible, nous avons supposé que le saut de température était constant sur une journée de mesure. Nous estimons commettre une erreur de 1°C sur la température finale. L'amplitude du saut de température vu par le laser sonde s'échelonne entre 2 et 8 degrés selon les conditions d'alignement et la puissance du laser pompe.

Les courbes de CD étant souvent très bruitées il est difficile d'en extraire une constante de temps, même après filtrage du signal par FFT. Cependant pour les courbes les moins bruitées les constantes de temps extraites de l'absorption et du CD coïncident. Pour les autres, nous avons vérifié que la courbe de CD était bien ajustée par la fonction quand nous imposions le temps de relaxation égal à celui obtenu par l'ajustement de la courbe d'absorption.

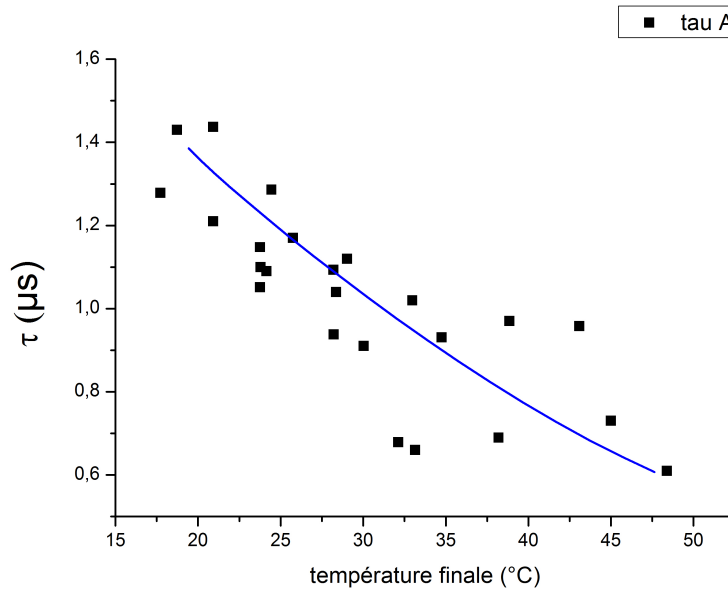


FIGURE 4.13 – Temps de relaxation issus des ajustements des courbes de CD pour le PGA dans l'eau. La courbe bleue montre la tendance décroissante.

On voit figure 4.13 que le temps de relaxation décroît comme attendu avec la température. Il varie entre 1,5 μs et 0,6 μs . Nous constatons une assez forte dispersion des temps de relaxation pour une même température finale, de l'ordre de 200 ns. Ces temps de relaxation sont légèrement différents de ceux obtenus par l'équipe de Martin Volk[29] : pour une température finale de 23 degrés nous obtenons un temps de l'ordre de 1,2 μs alors que l'on s'attend à un temps plus court à un pH de 4,7. Comme nous le verrons plus tard, cette différence est due au fait que ces mesures sont effectuées dans H₂O au lieu de D₂O.

Énergie d'activation globale

Si l'on considère que les réactions de déplieement et de replieement n'ont pas d'intermédiaire de réaction (modèle à deux états) elles doivent respecter la loi d'Arrhénius :

$$k = A.exp(\frac{-E_a}{RT}) \quad (4.18)$$

où E_a est l'énergie d'activation, R la constante des gaz parfaits.

On peut alors tracer la courbe $\ln(\frac{1}{\tau}) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT}$ pour vérifier si l'on obtient une droite et, le cas échéant, en déduire l'énergie d'activation globale du déplieement du PGA.

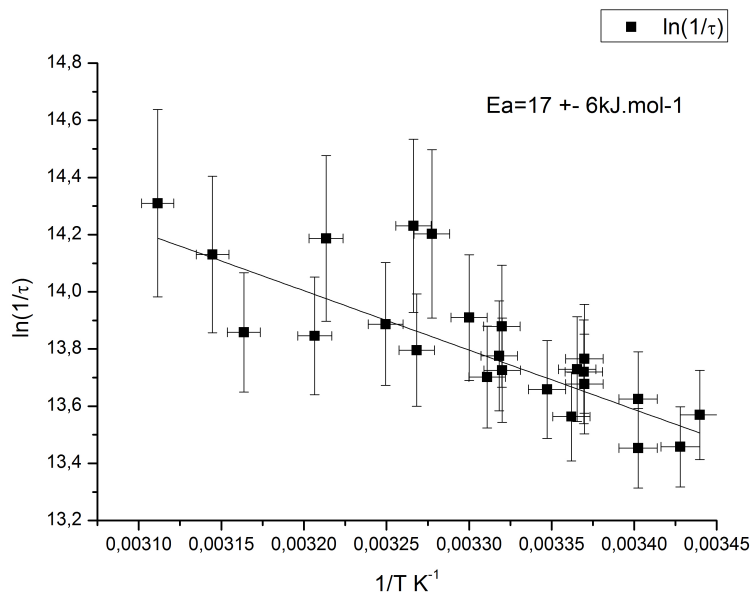


FIGURE 4.14 – Courbe d'Arrhenius de la réaction de déplieement du PGA dans l'eau. On estime l'erreur sur τ à 200 ns et l'erreur sur T à 1°.

On voit figure 4.14 que le temps de relaxation après un saut de température suit bien la loi d'Arrhénius avec une énergie d'activation de $E_a = 17 \pm 6 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Cela confirme donc que le modèle d'équilibre entre deux états déplié et replié fonctionne bien dans la limite de la précision de nos mesures.

Nous allons maintenant étudier les résultats obtenus dans l'eau lourde.

4.4 Déplieement du PGA dans l'eau lourde

Les mesures dans l'Infra-rouge sont très utilisées pour étudier les dynamiques de replieement ou déplieement des protéines. En particulier, la bande amide I entre 1630 et 1650 cm^{-1} qui correspond aux déformations de la chaîne polypeptidique, est très sensible aux structures secondaires. La position et l'amplitude de cette bande varie beaucoup avec l'hélicité. C'est cette bande d'absorption qui est généralement utilisée pour étudier le déplieement des polypeptides tels que le PGA[30].

Cependant, l'utilisation d'une sonde dans le domaine infra-rouge nécessite que la protéine soit placée dans une solution d'eau lourde, car l'eau a de nombreuses bandes d'absorption dans cette région ce qui empêche toute mesure. L'eau lourde, D₂O présente juste une bande autour de 1580 cm⁻¹ : le déplacement de cette bande avec la température est utilisé pour calibrer le saut de température dans les expériences de T-jump.

Avec notre expérience, nous pouvons mesurer le T-jump dans l'eau comme dans l'eau lourde. Nous nous sommes donc posés la question de savoir si la dynamique de dépliement du PGA est la même dans les deux milieux.

4.4.1 Les différences et similitudes entre l'eau et l'eau lourde

Dans ce paragraphe nous allons nous intéresser aux propriétés de l'eau et de l'eau lourde qui pourraient influencer sur le repliement du PGA.

Propriétés acide-base Nous savons que le repliement du PGA est très dépendant du pH car la chaîne protonée se replie plus facilement que la chaîne non protonée. Ainsi on peut en déduire que le repliement peut être influencé par la réaction acide-base entre le PGA et les ions H⁺ ou D⁺ de la solution.

Il est donc important de savoir que les constantes d'acidité¹ de l'eau et de l'eau lourde sont différentes :

$$\begin{array}{cc} \text{pKe}(\text{H}_2\text{O}) & \text{pKe}(\text{D}_2\text{O}) \\ 15.738 & 16.610 \end{array}$$

La force d'un acide faible va donc être différente selon qu'on le dissout dans l'eau ou dans D₂O. Ce phénomène a été mis en évidence par Robinson[31] qui montre la différence de pKa de plusieurs acides faibles dans l'eau et dans l'eau lourde. Les acides faibles se dissocient moins dans D₂O que dans l'eau.

Lors de nos préparations de solutions nous nous sommes efforcés de fixer le pH² et le pD des solutions à une valeur de 4.7 ce qui signifie que nous avons fixé la concentration en ions H⁺ et D⁺. Sachant que la constante d'acidité du PGA va être différente dans les deux solutions, on peut déterminer dans quelle solution le PGA est plus dissocié (moins protoné).

La réaction de dissolution du PGA dans l'eau a la constante $K_a = \frac{[\text{PGA}^-]h}{[\text{PGA}]}$. la réaction de dissolution du PGA dans D₂O a la constante $K_a' = \frac{[\text{PGA}'^-]d}{[\text{PGA}']}$. A l'aide d'un ajout de HCl ou de DCl j'ai ajusté la concentration d'ions H⁺ et D⁺ telle que $h=d$. D'après [31] $K_a' < K_a$ d'où :

$$\frac{[\text{PGA}^-]}{[\text{PGA}]} > \frac{[\text{PGA}'^-]}{[\text{PGA}']} \quad (4.19)$$

Donc le PGA est plus protoné dans D₂O que dans H₂O pour une même mesure de pH/pD. Dans D₂O le PGA est protoné comme si le pH était plus faible.

1. La constante d'acidité est la constante standard de la réaction d'un acide avec l'eau : $A + \text{H}_2\text{O} \rightarrow B + \text{H}_3\text{O}^+$ et s'écrit à l'équilibre $K_a = \frac{[B]h}{[A]}$. Le pKa est égal à $-\log(K_a)$. Pour l'eau cette constante est aussi appelée produit ionique de l'eau et est égale à $K_e = [\text{H}_3\text{O}^+][\text{HO}^-]$

2. $\text{pH} = -\log([H^+])$

Cette déduction est confirmée quand on compare les spectres de CD du PGA dans l'eau et dans l'eau lourde : on constate qu'à une température de 290K, l'hélicité du PGA dans l'eau lourde est supérieure à 50 % (voir figure 4.8) alors qu'à la même température elle est inférieure à 50 % dans l'eau (voir figure 4.9). Le PGA est donc plus replié dans l'eau lourde que dans l'eau pour une même concentration en ions H^+ ou D^+ .

Liaisons Hydrogène La liaison hydrogène est une liaison entre deux atomes très électronégatifs via un atome d'hydrogène [32]. L'atome d'hydrogène est lié de façon covalente à un des deux atomes. La force de la liaison augmente avec l'électronégativité des atomes impliqués : les liaisons hydrogène sont plus fortes entre atomes de fluor qu'entre atomes d'oxygène par exemple. La liaison hydrogène peut être renforcée si l'atome électronégatif est impliqué dans une molécule conjuguée qui augmente son caractère électronégatif.

Dans l'eau, la liaison hydrogène relie entre eux deux atomes d'oxygène de deux molécules différentes comme sur la figure 4.15.

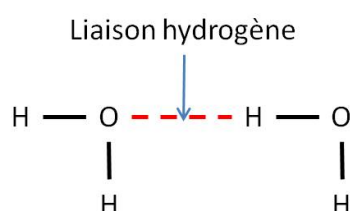


FIGURE 4.15 – Liaison hydrogène entre deux molécules d'eau.

Les liaisons hydrogène sont d'une importance capitale dans la structure des protéines car ce sont elles qui stabilisent les structures secondaires et tertiaires. En effet des liaisons hydrogène se forment entre le groupement N-H de la liaison peptidique et les atomes d'oxygène présents dans la protéine. En particulier, dans l'hélice alpha, un résidu n est lié par une liaison hydrogène au résidu $n+4$ ([4][32] et figure 4.16).

De récentes recherches ont montré que les liaisons hydrogène dans l'eau et dans l'eau lourde ont des longueurs et des symétries différentes[33][34]. Tout d'abord la liaison covalente entre l'atome d'hydrogène et l'oxygène dans H_2O est plus longue que la liaison covalente entre le deutérium et l'oxygène dans D_2O .

La liaison hydrogène est plus courte et plus asymétrique dans l'eau que dans l'eau lourde.

L'étude de [33] montre aussi que le nombre de liaisons hydrogène par molécule est plus faible dans l'eau que dans l'eau lourde. Ces différentes propriétés sont des indices amenant à penser que la liaison hydrogène, comme en phase gazeuse[35], est plus forte dans l'eau lourde que dans l'eau. En particulier, d'après [35], chaque substitution d'un H par un D augmente la force de liaison. Notons ici que plus une liaison est forte, plus il faut fournir d'énergie pour la rompre.

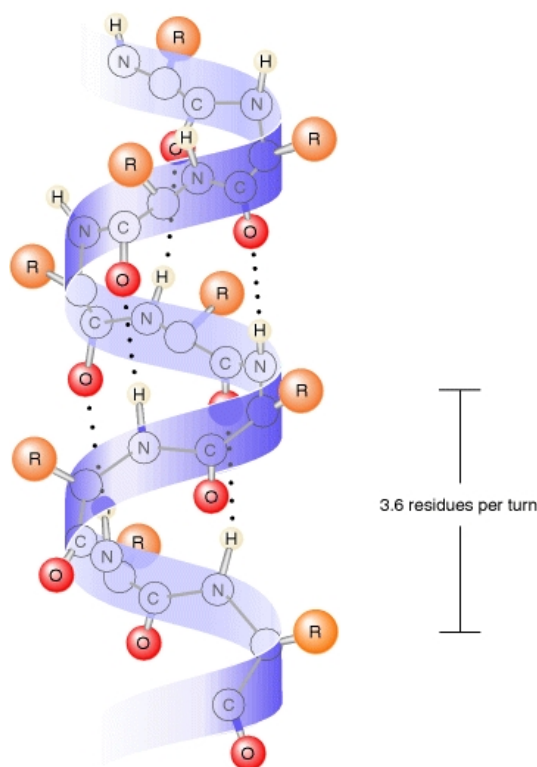


FIGURE 4.16 – Liaisons hydrogène dans une hélice alpha : en pointillés.

4.4.2 Resultats de l'expérience de T-jump

Pour l'expérience de T-jump dans D_2O les sauts de température estimés à partir du saut de CD s'échelonnent entre 0.3 et 2 degrés.

Malgré la grosse différence de saut de température entre les expériences dans l'eau et celles dans l'eau lourde, les deux séries de mesures peuvent être comparées : en effet lorsqu'on étudie la cinétique d'une réaction c'est la température finale qui détermine la vitesse de la réaction, et pas le saut de température.

Nous avons vérifié expérimentalement cette hypothèse en effectuant deux mesures successives de saut de température sur le PGA dans l'eau en diminuant la pompe de moitié et en changeant la température initiale pour que la température finale soit la même dans les deux cas.

Nous pouvons constater figure 4.17 que la relaxation de l'absorbance se fait à la même vitesse pour les deux sauts de température. L'ajustement de ces courbes nous donne des constantes de temps de 700 et 840 ns ce qui entre dans la dispersion habituelle des temps mesurés à une même température.

Les résultats des expériences dans l'eau lourde sont exploités de la même façon que pour le PGA dans l'eau (voir parties 4.3.1 et 4.3.2). Cependant comme le saut de température est plus petit, les courbes de CD sont la plupart du temps inexploitable et nous nous fions donc entièrement aux constantes de temps extraites du saut d'absorbance.

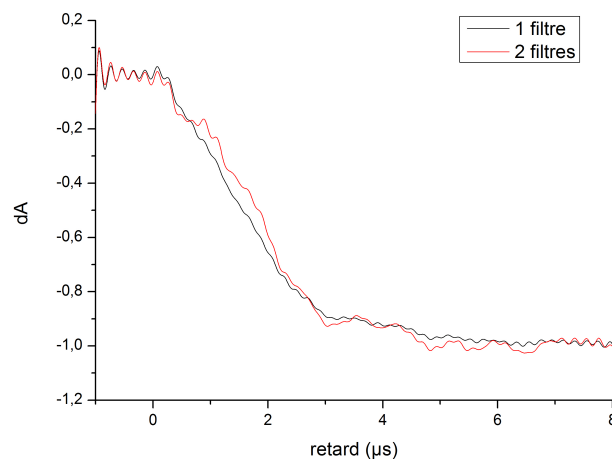


FIGURE 4.17 – Variation d'absorbance normalisée à -1 après un saut de température dans le PGA dans l'eau. Courbe noire : saut de 27 à 32 degrés. Courbe rouge : saut de 30 à 32 degrés.

Résultats bruts

Les temps de relaxation obtenus après un saut de température dans les solutions de PGA dans D2O sont regroupés sur la figure 4.18.

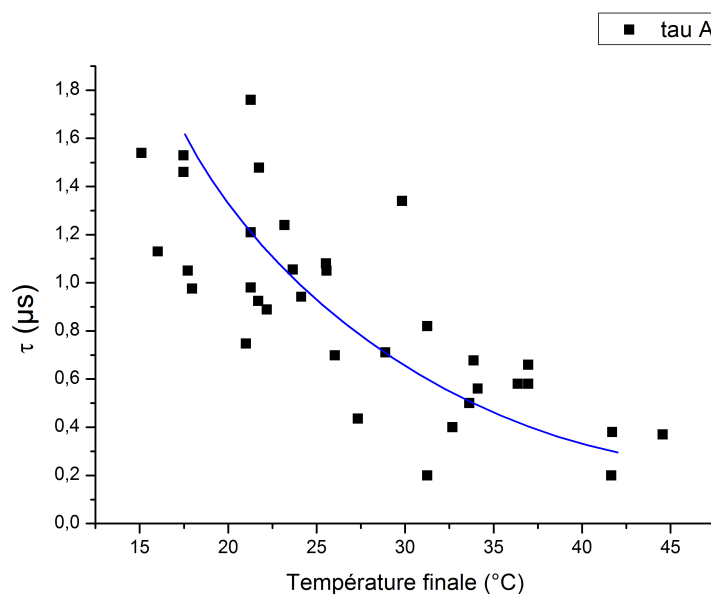


FIGURE 4.18 – Temps de relaxation dans le PGA dans D2O en fonction de la température. La courbe bleue montre la tendance décroissante.

Comme prévu le temps de relaxation décroît avec la température. Il varie entre $1.7 \mu s$ et $0.2 \mu s$. La dispersion des valeurs pour une même température est un peu plus grande que dans l'eau à cause de la plus faible valeur du saut de température et des mesures plus bruitées. Les temps de relaxation obtenus sont cohérents avec ceux obtenus par l'équipe de Martin Volk[29] : pour une température finale de $23^\circ C$ nous avons un temps de relaxation de l'ordre de $1 \mu s$ ce qui est attendu pour un pH de 4.7.

Énergie d'activation globale du PGA dans l'eau lourde

Comme pour le PGA dans l'eau, nous pouvons tracer la courbe d'Arrhénius et en déduire une valeur d'énergie d'activation.

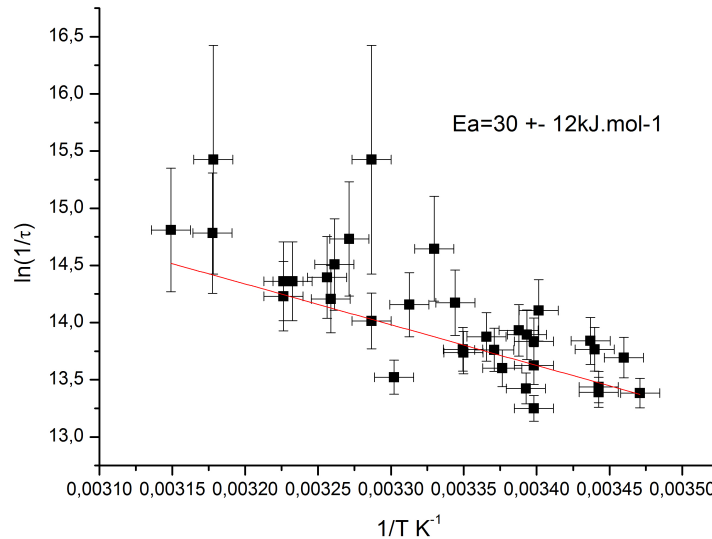


FIGURE 4.19 – Courbe d'Arrhenius des temps de relaxation obtenus dans le PGA dans D2O. Les incertitudes sont estimées à 200ns sur les temps et 1° sur les températures.

Nous constatons figure 4.19 que le dépliement du PGA dans l'eau lourde suit aussi une loi d'Arrhénius avec une énergie d'activation différente de celle obtenue dans l'eau : $E_a = 30 \pm 12 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

Les barres d'incertitude des énergies d'activation dans l'eau et dans l'eau lourde se recoupent : on ne peut pas dire qu'elles sont différentes. Cependant l'énergie d'activation globale est difficile à interpréter seule.

Nous allons pousser plus loin l'interprétation des temps de relaxation grâce à l'exploitation des courbes de fusion.

4.5 Interprétation

4.5.1 Temps de dépliement et de repliement

On peut déduire de la valeur de la constante d'équilibre de la réaction et de sa constante globale de vitesse les valeurs des constantes de temps du dépliement et du repliement.

$$K_{eq} = \frac{k_r}{k_d} = \frac{\tau_d}{\tau_r} \quad (4.20)$$

$$k_{obs} = \frac{1}{\tau_{obs}} = k_d + k_r \quad (4.21)$$

où $k = \frac{1}{\tau}$ désigne la constante de vitesse de repliement (indice r) ou de dépliement (indice d) et K_{eq} est la constante d'équilibre thermodynamique de la réaction de repliement.

On en déduit :

$$\tau_r = \tau_{obs} \left(1 + \frac{1}{K_{eq}}\right) \quad (4.22)$$

$$\tau_d = \tau_{obs} (1 + K_{eq}) \quad (4.23)$$

On peut calculer cette constante grâce aux valeurs de A et T_m issues des spectres de CD (voir tableaux 4.1, 4.2 et équation 4.10).

Propagation des incertitudes

Nous avons vu dans la partie 4.2 que la détermination des paramètres d'ajustement des courbes de fusion est entachée de grosses incertitudes. Nous devons donc prendre en compte ces incertitudes pour le calcul de K_{eq} ainsi que pour les temps de relaxation.

On rappelle l'expression de K_{eq} :

$$K_{eq}(T) = \exp\left(-\frac{A(T - T_m)}{R.T}\right) \quad (4.24)$$

Pour connaître les incertitudes sur K_{eq} issues des incertitudes sur A et T_m il faut dériver K_{eq} par rapport à chacune de ces grandeurs :

$$\frac{\partial K_{eq}}{\partial A} = \frac{K_{eq}}{R} \left(\frac{T_m - T}{T}\right) \quad (4.25)$$

$$\frac{\partial K_{eq}}{\partial T_m} = \frac{K_{eq}}{R} \frac{A}{T} \quad (4.26)$$

Ainsi l'incertitude sur K_{eq} notée $\sigma_{K_{eq}}$ s'exprime en fonction des incertitudes σ_A , et σ_{T_m} :

$$\sigma_{K_{eq}} = \frac{K_{eq}}{R} \sqrt{\left(\frac{T_m - T}{T}\right)^2 \sigma_A^2 + \left(\frac{A}{T}\right)^2 \sigma_{T_m}^2} \quad (4.27)$$

Ensuite on peut établir l'expression des incertitudes sur les temps de dépliement et de repliement en fonction de $\sigma_{K_{eq}}$ et de $\sigma_{\tau_{obs}}$:

$$\sigma_{\tau_r} = \sqrt{\left(1 + \frac{1}{K_{eq}}\right)^2 \sigma_{\tau_{obs}}^2 + \left(\frac{\tau_{obs}}{K_{eq}^2} \sigma_{K_{eq}}\right)^2} \quad (4.28)$$

$$\sigma_{\tau_d} = \sqrt{(1 + K_{eq})^2 \sigma_{\tau_{obs}}^2 + \tau_{obs}^2 \sigma_{K_{eq}}^2} \quad (4.29)$$

Comme défini précédemment l'incertitude sur τ_{obs} est évaluée à 200ns.

Dans l'eau

La variation de la constante d'équilibre de repliement avec la température, dont les valeurs sont présentées dans le tableau 4.3, est cohérente avec le fait que le PGA se déplie quand on augmente T. En effet, d'après la loi d'action des masses, à l'équilibre de la réaction on a $K_{eq} = \frac{a_{PGA_{replie}}}{a_{PGA_{deplie}}}$ où l'activité a est proportionnelle à la concentration, donc K_{eq} diminue avec la température.

Température finale (K)	Constante d'équilibre K_{eq}
291	2.4
297	2.1
301	1.9
306	1.7
311	1.5
316	1.35
321	1.2

TABLE 4.3 – Constante d'équilibre de la réaction de dépliement aux différentes températures dans l'eau

Grâce à ces valeurs nous sommes en mesure de calculer τ_d et τ_r pour chaque expérience (voir tableau 4.4).

Température finale (K)	$\tau_{obs}(\mu s)$	$\tau_r(\mu s)$	$\tau_d(\mu s)$
291	1.3	1.8	4.4
297	1.05	1.55	3.3
301	1.0	1.5	2.9
306	0.7	1.1	1.9
311	0.7	1.16	1.75
321	0.6	1.0	1.4

TABLE 4.4 – Temps de relaxation en fonction de la température finale

A cette étape du dépouillement il est à noter que les incertitudes sur les temps de relaxation sont énormes (au moins 50 %). Cependant l'erreur relative sur la courbe d'Arrhénius sera plus faible grâce au logarithme.

On constate que les temps de dépliement sont légèrement plus grands que ceux de repliement. Les deux temps doivent être égaux à la température de transition puis leur rapport doit ensuite s'inverser. Nous constatons bien que l'écart entre les deux constantes de temps diminue avec la température, mais la température de transition est au-delà de nos mesures de T-jump.

Dans l'eau lourde

Nous pouvons effectuer la même exploitation pour les mesures réalisées dans l'eau lourde grâce aux paramètres du tableau 4.1.

Les valeurs des constantes d'équilibre en fonction de la température sont données dans le tableau 4.5.

La constante d'équilibre est bien décroissante avec la température.

On en déduit les temps de dépliement et de repliement dans l'eau lourde présentés dans le tableau 4.6.

Nous constatons que le temps de relaxation de dépliement est toujours plus grand par rapport au temps de relaxation de repliement. Les deux constantes de temps diminuent avec la température, ce qui est témoin de l'accélération des réactions avec la température. Les deux constantes de temps

Température finale (K)	Constante d'équilibre K_{eq}
288	147
290	102
295	53
300	23.5
305	11
310	6
315	3

TABLE 4.5 – Constantes d'équilibre de la réaction de dépliement dans D₂O aux différentes températures

Température finale (K)	$\tau_{obs}(\mu s)$	$\tau_r(\mu s)$	$\tau_d(\mu s)$
288	1.54	1.55	228
290	1.25	1.3	129
295	1.06	1.1	57
300	0.6	0.6	14.7
305	0.4	0.4	4.8
310	0.6	0.7	4.2
315	0.3	0.4	1.2

TABLE 4.6 – Temps de relaxation de la réaction globale, du dépliement et du repliement aux différentes températures finales. Ne sont présentés ici qu'un échantillon des valeurs obtenues expérimentalement.

doivent être égales à la température de transition cependant nous n'atteignons pas cette température dans les expériences de T-jump.

A basse température, les temps de dépliement dans l'eau lourde sont très grands par rapport à ceux obtenus dans l'eau.

4.5.2 Énergies d'activation

Nous pouvons maintenant tracer les courbes $\ln(\frac{1}{\tau}) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT}$ pour chaque constante de temps et en déduire l'énergie d'activation des deux processus.

Dans l'eau

Le tracé des courbes d'Arrhénius pour le dépliement et le repliement du PGA dans H₂O donne deux énergies d'activation faibles et du même ordre de grandeur :

$$E_{a_r} = 11 \pm 6 \text{ kJ.mol}^{-1} \quad (4.30)$$

$$E_{a_d} = 28 \pm 6 \text{ kJ.mol}^{-1} \quad (4.31)$$

On peut voir figure 4.20 que les incertitudes sont très grandes et que ces dernières se recouvrent pour les deux courbes.

On peut comparer les valeurs obtenues avec l'énergie d'activation globale qui était de 17 kJ.mol^{-1} : cette énergie est encadrée par les deux énergies de dépliement et de repliement.

Pour le PGA dans l'eau on peut imaginer un diagramme énergétique de réaction où l'état déplié et l'état replié ont une énergie un peu différente avec une barrière d'activation du même ordre de

grandeur que cette différence (voir plus loin figure 4.22)

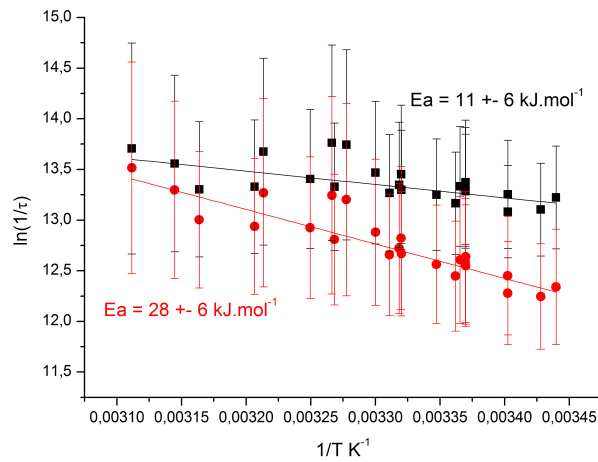


FIGURE 4.20 – Courbes d'Arrhenius relatives aux temps de dépliement (en rouge) et de repliement (en noir) dans H₂O.

Dans l'eau lourde

Le tracé des courbes d'Arrhénus pour le dépliement et le repliement dans D₂O (voir figure 4.21) donne les énergies d'activation :

$$E_{a_r} = 25 \pm 11 \text{ kJ.mol}^{-1} \quad (4.32)$$

$$E_{a_d} = 136 \pm 10 \text{ kJ.mol}^{-1} \quad (4.33)$$

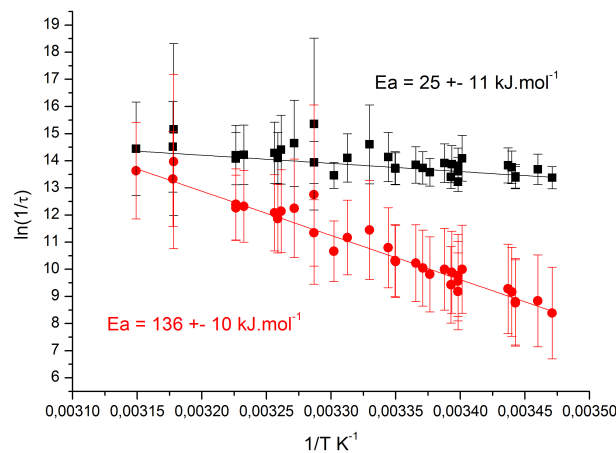


FIGURE 4.21 – Courbes d'Arrhenius relatives aux temps de dépliement (en rouge) et de repliement (en noir) dans D₂O.

L'énergie d'activation de repliement est comparable à celle obtenue par C. Krejtschi et K. Hauser[26] tandis que l'énergie d'activation de dépliement est bien plus grande, ce qui peut être dû à la différence de pH utilisé dans les expériences.

Encore une fois, l'énergie d'activation globale se situe entre les énergies d'activation de repliement et de dépliement.

4.5.3 Interprétation

Nous pouvons représenter figure 4.22 les profils énergétiques des réaction de dépliement dans l'eau et dans l'eau lourde en considérant les valeurs d'énergies d'activation que nous avons déterminées et en appliquant l'hypothèse selon laquelle la réaction se fait sans intermédiaire[26][36].

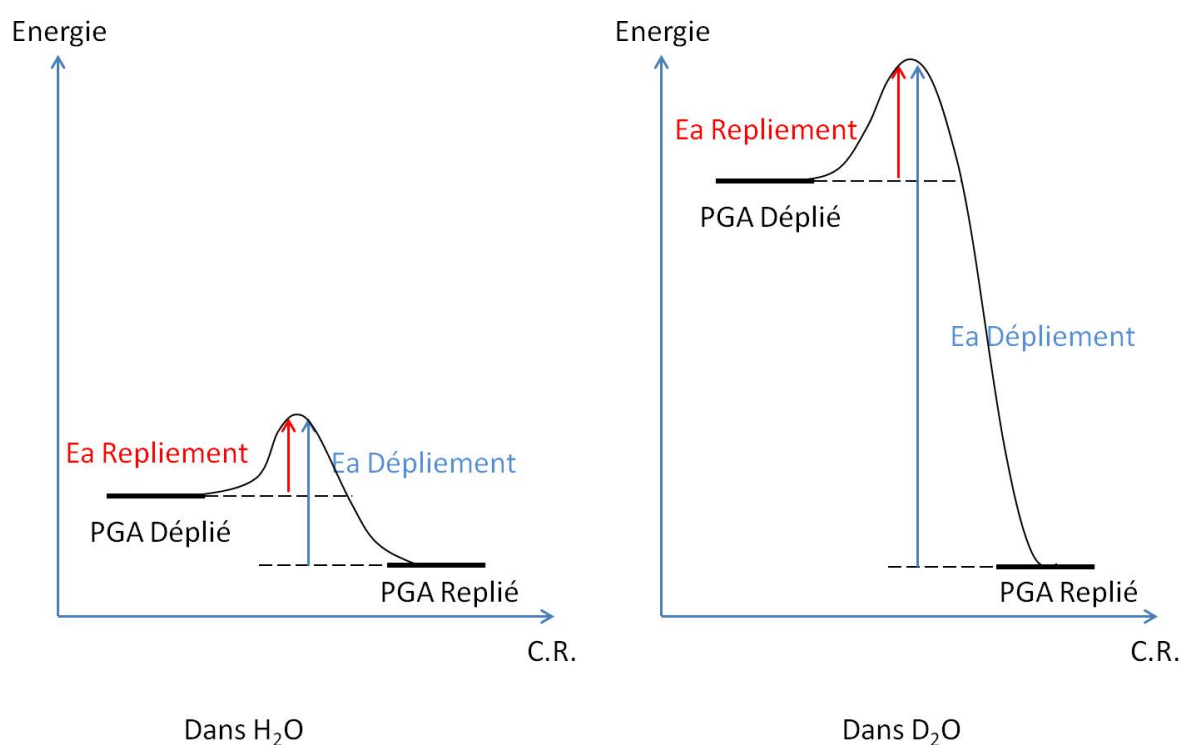


FIGURE 4.22 – Profils énergétiques dans l'eau et l'eau lourde de la réaction de dépliement. C.R. désigne la coordonnée de réaction.

Une première explication peut venir de la différence de pKa de l'acide glutamique dans l'eau et dans l'eau lourde. Comme expliqué plus haut, à un même pH/pD le PGA n'a pas la même hélicité dans l'eau et dans l'eau lourde. Si l'on se réfère aux figure 4.8 et 4.9 on voit qu'à température ambiante, le PGA a une hélicité de 0.44 dans l'eau et de 0.54 dans l'eau lourde. Cependant d'après les mesures de [30], les temps de relaxation ne varient que très peu entre une hélicité de 0.44 et une hélicité de 0.54 dans l'eau lourde : ces valeurs d'hélicité correspondent en effet au maximum du temps de relaxation. Ainsi cette petite différence d'état initial ne permet pas d'expliquer nos résultats.

Si l'on considère maintenant le fait que le PGA est un acide faible, sa constante d'acidité doit dépendre de la température. Et cette dernière dépendant aussi du solvant, on peut imaginer que la variation du pKa du PGA avec la température ne sera pas la même dans l'eau et dans l'eau lourde. Alors un même saut de température va entraîner une déprotonation d'amplitude différente dans les deux solvants.

Des expériences de repliement du PGA après un saut de pH[37][38] montrent que la dynamique

peut être très lente, jusqu'à des constantes de temps de l'ordre de la ms. De telles constantes de temps ne sont pas observées par d'autres méthodes d'initiation du repliement telles que le saut de température[29][30] ou le saut de champ électrique[39].

Or les expériences de T-jump, par le possible changement de la constante d'acidité, peuvent impliquer un petit saut de pH. Ce qui peut expliquer d'une part que les constantes de temps observées sont lentes par rapport au dépliement d'autres molécules formant des hélices alpha (comme la poly-alanine qui se dépie à l'échelle de 100 ns [40]), d'autre part que la dynamique est affectée par le fait que le solvant soit de l'eau ou de l'eau lourde.

Comme nous ne connaissons pas la variation du pKa du PGA avec la température dans l'eau et l'eau lourde, nous ne pouvons pas aller plus loin dans cette explication.

Nous pouvons aussi envisager une explication venant des liaisons hydrogène. Comme nous l'avons précédemment dit, les hélices alpha voient leur structure stabilisée par les liaisons hydrogène intramoléculaires. Ainsi, une différence de ces forces de liaison entre l'hydrogène et le deutérium peut influencer sur la stabilité de l'hélice de PGA. Cependant les atomes d'hydrogène mis en jeu dans ces liaisons intramoléculaires ne sont *a priori* pas remplacés par des atomes de deutérium quand le PGA est dissous dans l'eau lourde. En effet, seuls les hydrogènes impliqués dans la fonction acide carboxylique sont remplacés par des atomes de deutérium : le PGA est utilisé sous forme de sel, donc complètement déprotoné, et lorsqu'on le met en solution dans l'eau lourde, ce sont des atomes de deutérium qui protonent les fonctions acide.

Mais les liaisons hydrogène avec le solvant ont aussi une influence sur le dépliement de l'hélice du PGA. Une expérience menée par Stanley et al.[36] montre qu'on peut initier le repliement du PGA en modifiant la pression osmotique, c'est à dire en modifiant le coût énergétique d'interaction avec les molécules d'eau. Ainsi, s'il est plus favorable au PGA de former des liaisons hydrogène intramoléculaires, le repliement est favorisé. Au contraire, si les liaisons hydrogène avec le solvant sont plus faciles à créer, le dépliement est favorisé.

Lors du dépliement, les liaisons hydrogène intramoléculaires qui stabilisent l'hélice α et les liaisons entre deux molécules d'eau sont remplacées par des liaisons $N-H \cdots OH_2$ ou $N-H \cdots OD_2$ selon le solvant. Ainsi le dépliement implique de rompre une liaison hydrogène entre deux molécules de solvant. Nous avons vu partie 4.4.1 que les liaisons hydrogène sont d'autant plus fortes qu'il y a d'atomes d'hydrogène substitués par des deuteriums[35]. Dans l'eau lourde, il sera donc plus difficile pour le solvant de rompre ses liaisons hydrogène intermoléculaires en faveur de liaisons avec la protéine.

Nous pouvons ainsi interpréter le fait que le repliement est favorisé dans l'eau lourde. Au contraire, dans l'eau normale, les liaisons hydrogène entre molécules d'eau et les liaisons entre l'eau et la protéine ont une plus petite différence d'énergie : alors le dépliement est moins défavorisé.

La viscosité du solvant peut aussi influencer la vitesse de dépliement du PGA[41]. Or la viscosité de l'eau lourde est 20 % plus élevée que celle de l'eau légère[42, 43], et cette différence peut dépendre de la température. On peut alors imaginer que le dépliement peut être ralenti dans l'eau lourde.

4.6 Conclusion de l'étude

Malgré les incertitudes inhérentes à nos mesures, nous avons montré grâce à notre expérience de T-jump suivi par dichroïsme circulaire résolu en temps qu'il existe des différences de dynamique de dépliement pour le PGA selon que celui-ci est dissout dans l'eau ou dans l'eau lourde.

Ainsi nous mettons en évidence ici une différence entre eau et eau lourde qui avait été ignorée dans les expériences utilisant des sondes dans l'infra-rouge.

Il reste cependant à déterminer si de telles différences existent pour toutes les protéines, ou sont seulement spécifiques au repliement des hélices alpha, voire spécifiques au PGA qui, en tant que molécule acide, est très sensible à la nature des protons (légers ou lourds) avec lesquels elle interagit.

Il serait intéressant par exemple d'effectuer la même campagne de mesures sur une hélice α non sensible au pH comme la polyalanine. Les temps de repliement beaucoup plus courts[40] de cette hélice imposent une amélioration du système d'acquisition.

Troisième partie

Dynamique dans les protéines photosenseurs

Chapitre 5

Étapes précoces du photocycle de la PYP

5.1 La photoactive yellow protein

5.1.1 Description

La photoactive yellow protein, PYP, est une petite protéine (125 acides aminés) senseur de lumière bleue issue de la bactérie *Halorhodospira halophila*. On pense qu'elle est la base du mécanisme de recherche de l'obscurité de la bactérie[44]. La PYP est un système modèle pour de nombreuses études en photochimie et repliement des protéines[45][46].

La PYP est une protéine soluble dans l'eau contenant un chromophore : l'acide 4-hydroxycinnamique (p-coumaric) (voir figure 5.1).

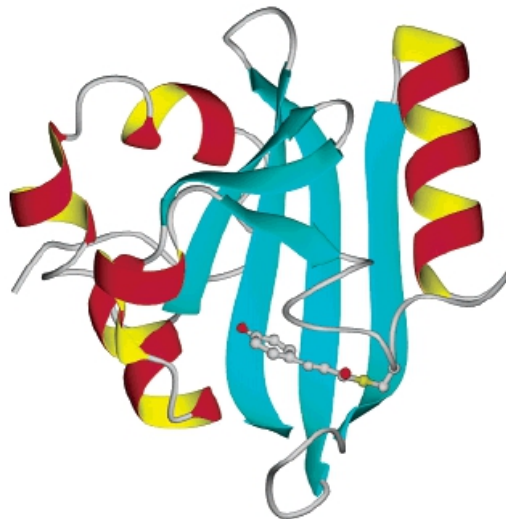


FIGURE 5.1 – Structure ruban de la PYP issue de [46]

Ce chromophore est lié à la protéine par une unique liaison covalente avec la cystéine 69 (voir figure 5.2). Il est aussi impliqué dans un réseau de liaisons hydrogène avec l'acide glutamique 46, la tyrosine 42, la threonine 50 et la cystéine 69[47][48].

La PYP est très étudiée pour son photocycle, durant lequel le chromophore et la protéine subissent

d'importants changements conformationnels. C'est ce photocycle qui serait à l'origine de la réponse de la bactérie à la lumière.

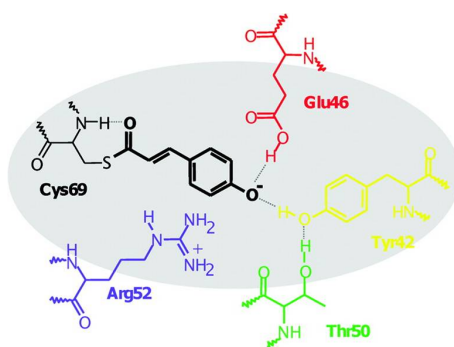


FIGURE 5.2 – Structure de l'environnement du chromophore de la PYP et ses liaisons avec la protéine [48]

De nombreuses protéines mutantes de la PYP ont été créées afin d'étudier l'influence de différents acides aminés sur le rendement du photocycle, la force des liaisons hydrogènes et autres caractéristiques de la protéine[49].

Nous avons effectué nos mesures sur la protéine mutante PYP R52Q. Dans cette protéine, l'arginine52 est remplacée par une glutamine¹ ce qui diminue le rendement d'entrée dans le photocycle (voir plus loin) et change quelque peu les temps de relaxation des différents intermédiaires. Les spectres de CD et d'absorbance du mutant R52Q et de la protéine sauvage sont cependant identiques, indiquant peu de changements au niveau du chromophore (voir figure 5.3).

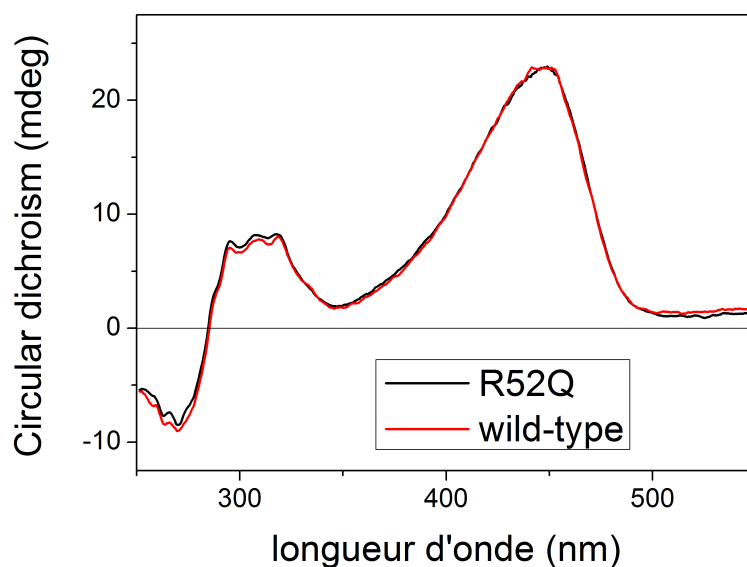


FIGURE 5.3 – Comparaison des spectres de CD de la PYP sauvage et du mutant R52Q

1. L'arginine est un acide aminé chargé positivement, pressenti comme stabilisateur et promoteur de la photoisomérisation du chromophore. Il a été montré que cette substitution n'empêche pas le photocycle[50]

5.1.2 Le photocycle de la PYP

A l'origine du photocycle de la PYP on trouve l'absorption d'un photon bleu par le chromophore. Ce dernier subit une isomérisation trans-cis qui provoque ensuite les changements conformationnels de la protéine.

Les différents intermédiaires du photocycle ont été abondamment étudiés par les multiples méthodes de spectroscopie à la disposition des chercheurs et sont presque tous bien déterminés, de même que les transformations qui mènent d'un intermédiaire à un autre et leurs échelles de temps (voir figure 5.4).

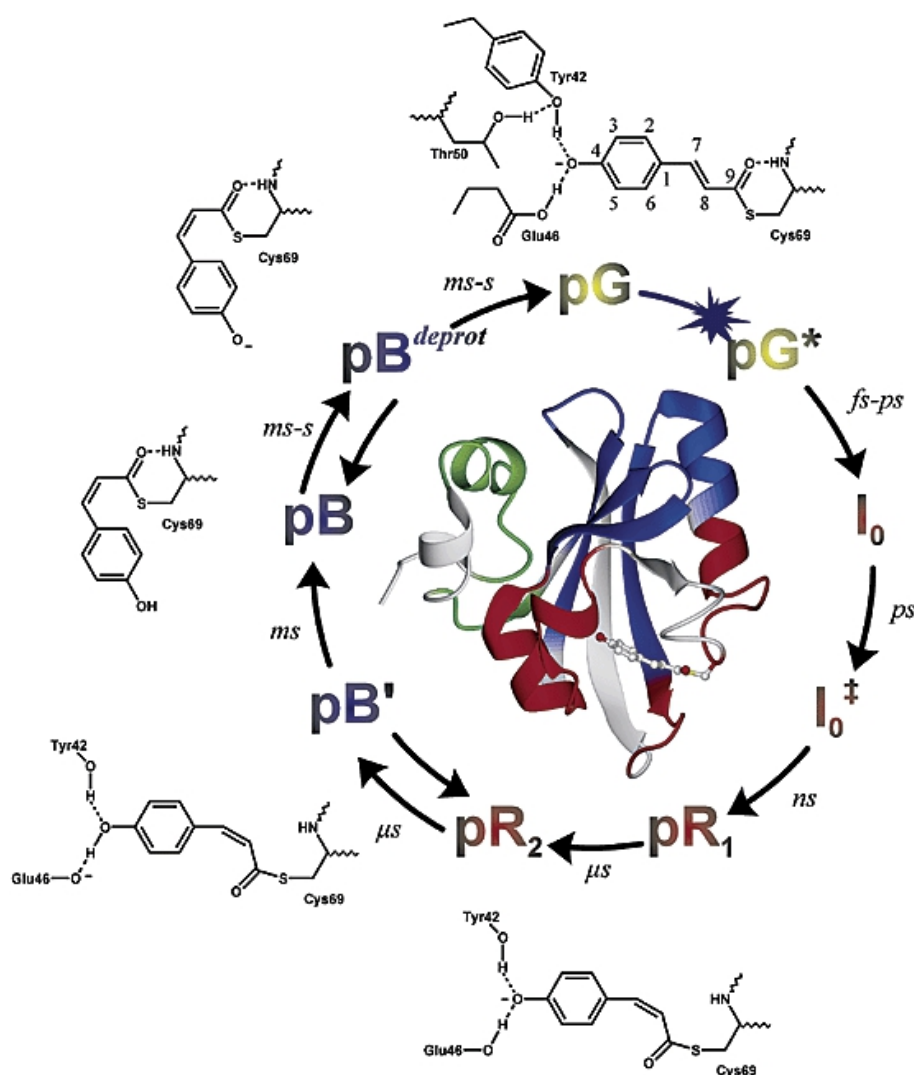


FIGURE 5.4 – Toutes les étapes du cycle de la PYP identifiées par spectroscopie UV/visible résolue en temps. L'état fondamental est noté pG, l'état excité pG*. La structure de la protéine représentée au centre est colorée selon l'amplitude des changements conformationnels dans l'état signalant pB. En vert : grand changement dans la partie N-terminale. En rouge : grands changements dans le voisinage du chromophore. Bleu : pas de changements.[46]

Cependant, seules 30 % des molécules excitées entrent dans le photocycle pour la PYP sauvage, et 20 % pour la PYP R52Q; les autres se dés excitent vers l'état fondamental via un intermédiaire X (ou GSI) dont on ignore la structure (voir figure 5.5).

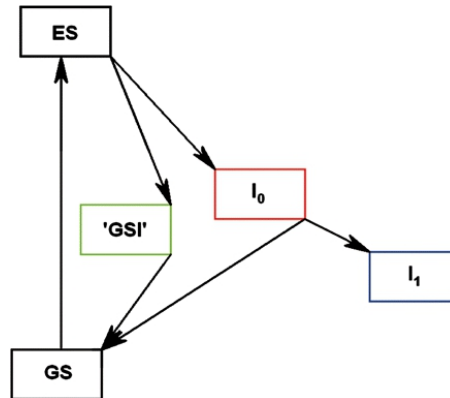


FIGURE 5.5 – Modèle simplifié des premiers pas du photocycle de la PYP.

Après l'absorption d'un photon, la première étape du photocycle met en jeu une isomérisation trans-cis de la double liaison du chromophore. Cette isomérisation a lieu lors de la transition entre l'état excité et le premier intermédiaire I_0 . Dans l'état excité, le groupement carbonyle se tord dans une configuration supposée quasi cis de la double liaison et met à mal la liaison hydrogène entre l'oxygène et la cystéine 69.

Certaines études montrent que l'entrée dans le photocycle semble conditionnée par la rupture des liaisons hydrogène entre le chromophore et la protéine[47] au cours de cette rotation partielle du groupement carbonyle.

Si la liaison hydrogène se rompt, l'isomérisation trans-cis peut avoir lieu et la protéine entre dans le photocycle.

Si la liaison ne se rompt pas, le chromophore relaxe vers l'état fondamental via l'intermédiaire GSI. Nous nous posons alors la question de savoir si, dans l'intermédiaire GSI, le groupement carbonyle C=O est encore tordu, ou s'il a retrouvé sa position initiale.

5.1.3 L'intermédiaire GSI

L'intermédiaire GSI (ground state intermediate) a été identifié pour la première fois via la construction de modèles cinétiques pour comprendre le faible rendement d'entrée dans le photocycle.

Comme nous l'avons dit plus haut, dans la protéine sauvage, seules 30% des molécules entrent dans le photocycle après photoexcitation. C'est en cherchant à décrire entièrement le processus d'absorption et de désexcitation de la PYP (par le photocycle ou non) que le GSI a été introduit dans les modèles[51].

Au cours de ce travail de recherche nous avons effectué des mesures qui nous permettent de donner des indications sur la structure du chromophore dans l'état excité et dans l'intermédiaire GSI.

En effet, nous savons que l'état excité, dans lequel le chromophore est tordu et le groupement carbonyle loin de sa position initiale, se relaxe vers l'état fondamental via l'intermédiaire GSI. Au cours de cette relaxation, le groupement carbonyle doit retrouver sa position correspondant à un chromophore non tordu. La question se pose de savoir si le groupement carbonyle a déjà repris sa place dans l'intermédiaire GSI, ou si ce mouvement a lieu lors de la relaxation de GSI vers l'état fondamental.

L'équipe de Van Grondelle précise dans son article [51] que l'intermédiaire GSI ne peut pas être seulement un analogue vibrationnellement chaud de l'état fondamental.

La difficulté de l'interprétation de nos mesures va résider dans le fait que la relaxation de l'état excité vers GSI ainsi que celle de GSI vers l'état fondamental ont toutes deux un temps caractéristique d'environ 3 ps. Comment alors distinguer les deux espèces ?

5.2 Mesure du dichroïsme circulaire résolue en temps

Nous avons effectué sur la PYP une mesure de dichroïsme circulaire résolue en temps grâce à la méthode pompe sonde et la technique de mesure du CD avec le compensateur de Babinet-Soleil. Le montage expérimental est résumé dans la figure 5.9. L'expérience a été menée à différentes longueurs d'onde sonde : 301, 310, 318, 332, 351 et 355 nm.

Nous avons choisi ce domaine spectral car il correspond aux transitions du carbonyle du chromophore de la PYP[52] (voir figure 5.6). En particulier, le dichroïsme circulaire dans l'UV du carbonyle donne des renseignements précis sur l'environnement de celui-ci.

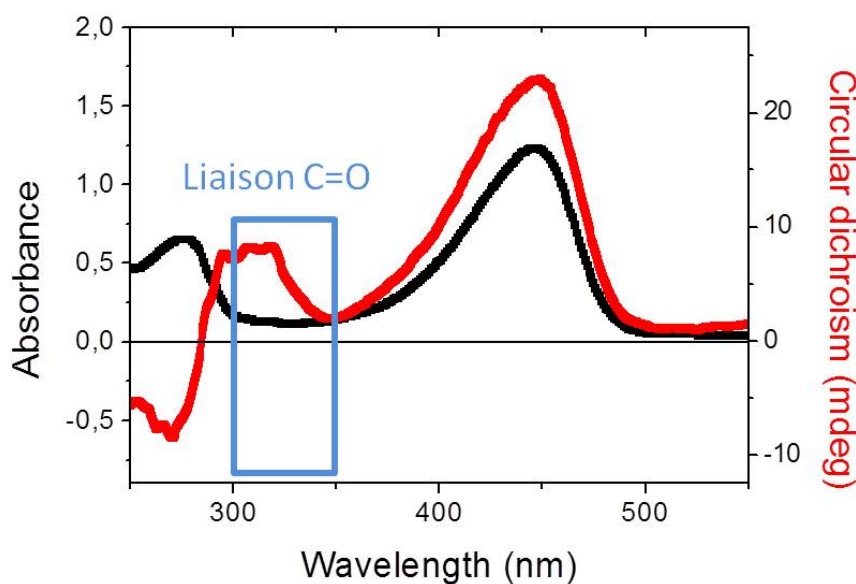


FIGURE 5.6 – Spectre de CD et d'absorption de la PYP. En bleu la zone de longueurs d'onde correspondant au groupement carbonyle du chromophore.

De précédentes expériences montrent qu'il existe une absorption de l'état excité dans ce domaine spectral et on peut supposer que celle-ci implique les orbitales du carbonyle.

De plus, dans le domaine spectral choisi, les photoproduits impliqués dans le photocycle n'absorbent pas ou très peu, ce qui nous permet de ne mesurer que des signaux issus des protéines qui n'entrent pas dans le photocycle (figure 5.7).

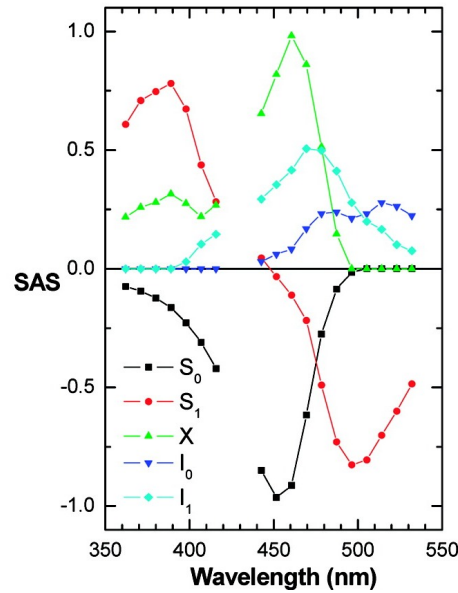


FIGURE 5.7 – Spectres associés aux espèces S_1 , X , I_0 et I_1 obtenus par analyse ciblée des spectres d'absorption différentielle [53]

5.2.1 L'expérience pompe sonde

Obtention des faisceaux pompe et sonde

Les faisceaux pompe et sonde sont tous deux générés à partir des impulsions à 1 kHz amplifiées d'un laser Titane Saphir réglé à 840 nm[20].

A la sortie de l'amplificateur, le faisceau laser est divisé en deux par une lame séparatrice, comme indiqué sur le schéma 5.8. Les deux parties du faisceau subissent des opérations d'optique non linéaire afin de mener aux longueurs d'onde pompe et sonde.

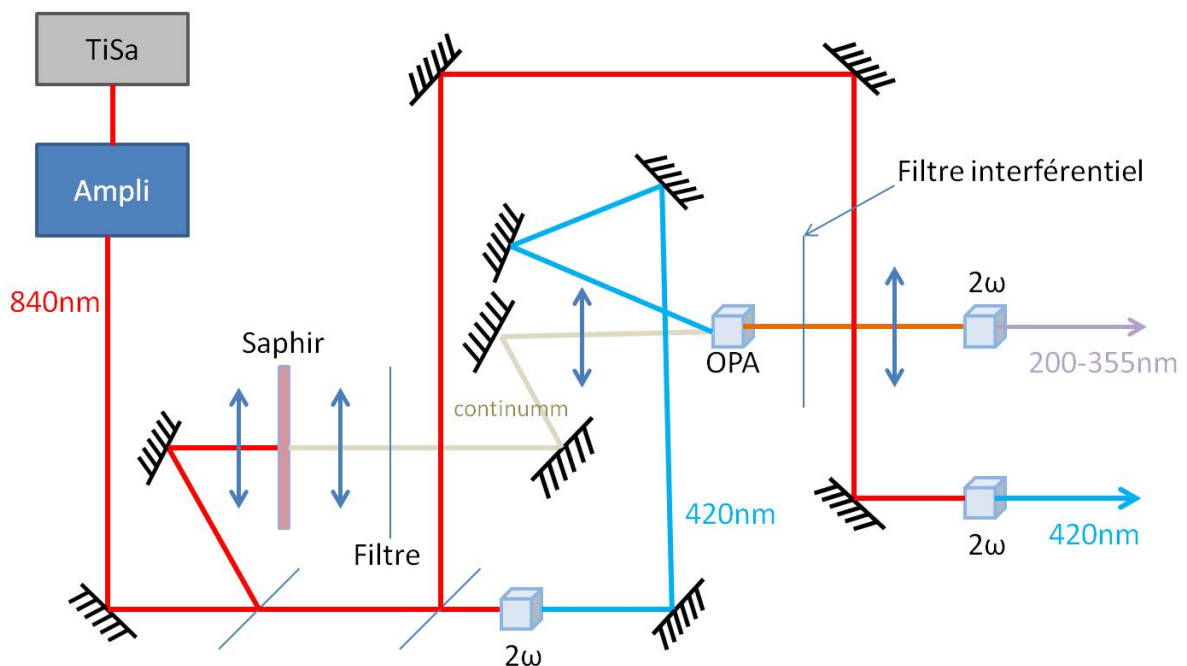


FIGURE 5.8 – Schéma du montage d'optique non linéaire permettant l'obtention des faisceaux pompe et sonde

La pompe à 420 nm est directement obtenue par un doublage de fréquence du faisceau du titane saphir.

Nous obtenons une sonde accordable entre 200 et 355 nm via les opérations d'optique non linéaire suivantes :

- génération d'un continuum par une moitié du faisceau grâce à une lame de saphir
- amplification paramétrique optique d'une des longueurs d'onde du continuum pompée par l'autre moitié du faisceau à 420 nm. L'accord de phase (c'est à dire l'orientation du cristal de BBO) permet le choix de la longueur d'onde visible amplifiée
- doublage de fréquence du faisceau visible amplifié grâce à un cristal de BBO pour obtenir une longueur d'onde UV.

Déroulement d'une mesure

On rappelle figure 5.9 le montage expérimental permettant la mesure du CD résolue en temps à l'aide du compensateur de Babinet-Soleil.

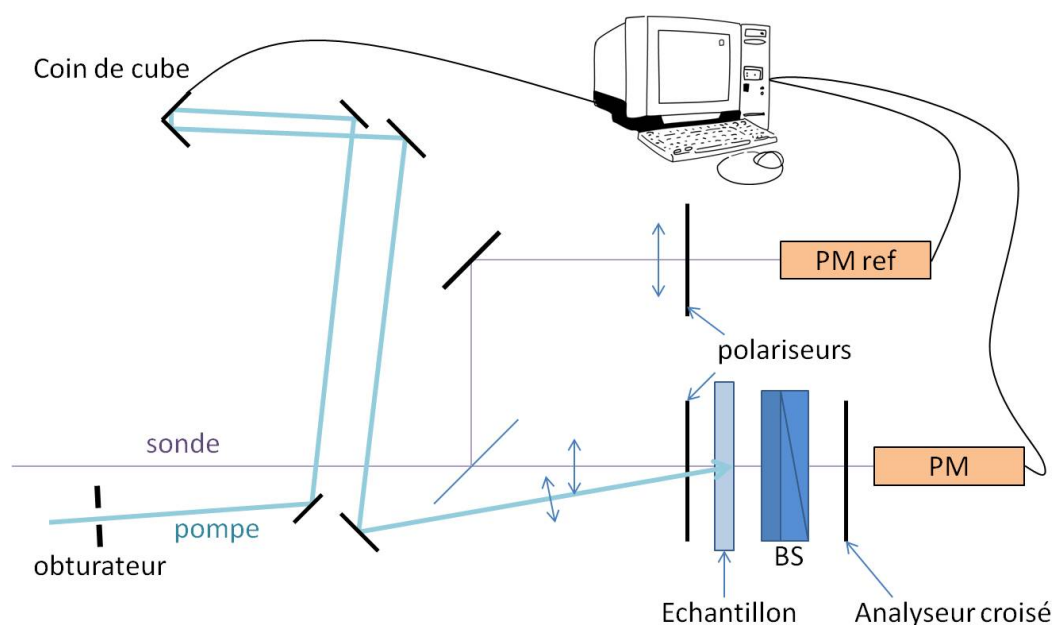


FIGURE 5.9 – Schéma du montage pompe sonde expérimental. Sur le schéma ne figure pas la chaîne non linéaire à l'origine des faisceaux. Le signal du PM est envoyé sur l'ordinateur et divisé par le signal de référence pour s'affranchir des fluctuations du laser sonde.

Le retard entre la pompe et la sonde est induit sur la pompe grâce à une ligne à retard munie d'un coin de cube mobile sur un rail parallèle à la direction de propagation du faisceau.

L'acquisition est dirigée par ordinateur à l'aide d'un programme Delphi. L'ordinateur émet et reçoit différents signaux :

- commande du coin de cube, qui détermine le retard pompe-sonde
- commande du moteur du compensateur de Babinet-Soleil, qui déplace le prisme mobile et fixe ainsi le déphasage introduit
- commande de l'obturateur sur le faisceau pompe
- réception des signaux des photomultiplicateurs

Pour chaque longueur d'onde nous avons effectué deux types de mesures. Tout d'abord une mesure pompe-sonde simple pour obtenir la dynamique de l'absorption en fonction du délai. Cette mesure ne nécessite pas de faire varier le déphasage du Babinet-Soleil. L'acquisition d'un point prend peu de temps, ce qui permet une grande résolution temporelle. L'acquisition d'une courbe de 40 points sur 20 ps prend environ 5 minutes. On moyenne ensuite une vingtaine de courbes pour diminuer le bruit. L'acquisition totale prend 1h40.

Ensuite nous avons effectué une mesure de l'absorption et du dichroïsme circulaire induits par la pompe en fonction du délai grâce à la méthode expliquée dans la partie 2.3.1. Pour chaque délai pompe sonde, deux paraboles sont enregistrées : l'une sans pompe et l'une avec pompe. Le programme d'acquisition effectue un ajustement de ces paraboles pour en calculer les coefficients et en déduit la valeur du CD et de la variation d'absorption induits par la pompe (équation 2.37). L'acquisition d'une courbe de 12 points prend 35 minutes ce qui explique qu'on ne recherche pas une grande résolution temporelle pour ces mesures. Pour améliorer la mesure, on effectue la moyenne sur 8 courbes individuelles. Au total, une acquisition à une longueur d'onde donnée prend donc environ 4 heures.

En raison de la haute sensibilité de l'ajustement des paraboles, les courbes obtenues sont très bruitées. Parfois la variation de CD ou d'absorption ne sort pas du bruit.

5.2.2 Nombre de molécules excitées

Afin de pouvoir déduire de nos mesures la valeur de l'absorption et du CD de l'état excité, nous devons calculer le nombre de molécules excitées par la pompe.

Pour cela nous devons connaître le nombre de photons dans une impulsion pompe, en déduire le nombre de molécules excitées vues par la sonde et comparer celui-ci au nombre de molécules présentes dans le volume balayé par la sonde.

Pour ce calcul nous avons besoin de connaître les dimensions des faisceaux pompe et sonde mesurées à l'aide d'un trou calibré de $50\text{ }\mu\text{m}$ données dans le tableau 5.1.

pompe	w_x	208 μm
	w_y	137 μm
sonde	σ_x	83 μm
	σ_y	34 μm

TABLE 5.1 – Taille des faisceaux pompe et sonde mesurée avec un trou de $50\text{ }\mu\text{m}$

Nombre de molécules sondées

Nous pouvons calculer le nombre de molécules qui vont interagir avec la sonde en multipliant le volume sondé, pondéré par le profil de la sonde, par la concentration. En effet, le nombre de molécules sondées en un point va être proportionnel à l'intensité de la sonde en ce point, donc le nombre total de molécules sondées doit prendre en compte le profil d'intensité gaussien.

La sonde a une forme de gaussienne elliptique de largeurs σ_x et σ_y .

Le nombre de molécules sondées s'écrit :

$$N_m = Cl \int \int e^{(-\frac{x^2}{2\sigma_x^2})} e^{(-\frac{y^2}{2\sigma_y^2})} dx dy \quad (5.1)$$

avec C la concentration et l la longueur de la cuve. Nous déduisons Cl grâce à la loi de Beer-Lambert à 420 nm : $A = \epsilon l C$ connaissant $A = 1.058$ et $\epsilon = 4550 \text{ mol}^{-1} \text{ m}^2$.

Nous obtenons :

$$N_m = 2,48.10^{12}$$

Nombre de molécules excitées

Pour connaître le nombre de photons qui vont effectivement exciter des molécules dans le volume balayé par la sonde nous calculons d'abord le nombre de photons absorbés par la solution dans une impulsion pompe.

Ce nombre s'écrit :

$$N_p = \frac{E_0(1 - 10^{-A})}{h \frac{c}{\lambda}} \quad (5.2)$$

où $E_0 = 0.954 \mu J$ est l'énergie d'une impulsion pompe, $A = 1,058$ l'absorbance de la solution de PYP à la longueur d'onde pompe, h la constante de Planck, c la vitesse de la lumière dans le vide et $\lambda = 420 \text{ nm}$ la longueur d'onde de la pompe.

Etant donnés ces paramètres on trouve le nombre de photons : $N_p = 1,84.10^{12}$.

Ces photons sont répartis sur le volume de la pompe qui peut être décrit comme une gaussienne elliptique avec les largeurs horizontales et verticales w_x et w_y . La fonction de répartition des photons dans un plan perpendiculaire à la direction de propagation s'écrit donc :

$$R_p(x, y) = \frac{N_p}{2\pi w_x w_y} e^{(-\frac{x^2}{2w_x^2})} e^{(-\frac{y^2}{2w_y^2})} \quad (5.3)$$

Nous pouvons maintenant calculer le nombre de molécules excitées par la pompe qui seront vues par la sonde. Pour cela il faut intégrer la fonction de répartition des photons pompe multipliée par le profil transverse de la sonde (on suppose que les deux faisceaux sont centrés sur le même point).

Le nombre de molécules excitées dans le volume sondé s'écrit donc :

$$N_e = \int \int R_p(x, y) e^{(-\frac{x^2}{2\sigma_x^2})} e^{(-\frac{y^2}{2\sigma_y^2})} dx dy \quad (5.4)$$

$$\begin{aligned} &= \frac{N_p}{2\pi w_x w_y} \int \int e^{(-\frac{x^2}{2}(\frac{1}{w_x^2} + \frac{1}{\sigma_x^2}))} e^{(-\frac{y^2}{2}(\frac{1}{w_y^2} + \frac{1}{\sigma_y^2}))} dx dy \\ &= N_p \sigma_x \sigma_y \frac{1}{\sqrt{w_x^2 + \sigma_x^2}} \frac{1}{\sqrt{w_y^2 + \sigma_y^2}} \end{aligned} \quad (5.5)$$

Finalement nous obtenons :

$$N_e = 1,64.10^{11}$$

Donc la pompe excite seulement $\frac{N_e}{N_m} = 6.6\%$ des molécules de PYP présentes dans le volume sondé.

5.3 Résultats de la mesure

Des mesures de test² ont été effectuées sur la molécule de PYP-wt puis la campagne de mesure complète sur PYP-R52Q. Aucune différence majeure n'a été observée entre les deux protéines concernant l'amplitude et la dynamique des signaux mesurés.

Nous ne présentons ici que les résultats concernant PYP-R52Q.

5.3.1 Pompe sonde simple en absorption

A toutes les longueurs d'onde étudiées on observe un saut instantané d'absorption dû au passage dans l'état excité puis une décroissance exponentielle de l'absorption (voir figure 5.10).

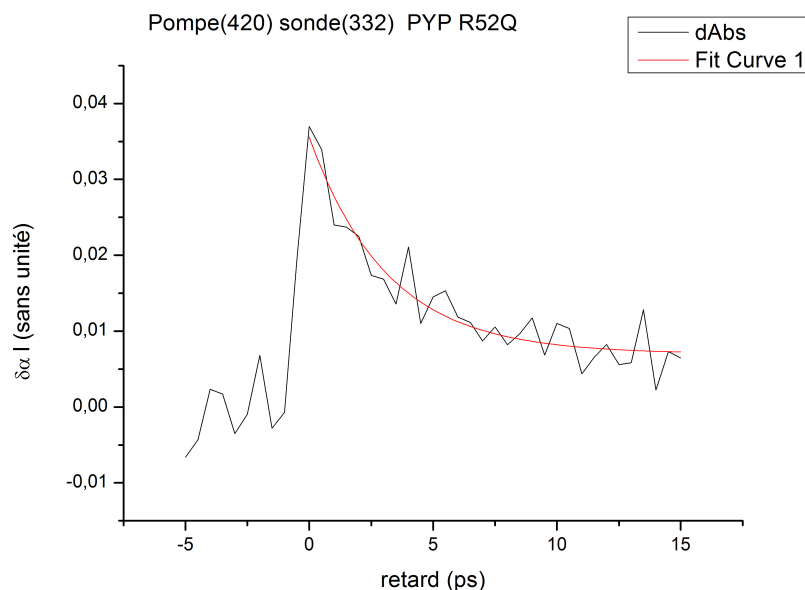


FIGURE 5.10 – Absorption en fonction du retard pompe-sonde dans une solution de PYP R52Q. La longueur d'onde de la sonde est 332 nm

Les amplitudes et constantes de temps sont regroupés dans le tableau 5.2.

Comme on le voit sur la figure 5.10, le changement d'absorption ne revient pas à zéro après la relaxation de l'état excité. Ceci peut être interprété par la création de radicaux à longue durée de vie : des états qui ne relaxent pas vers l'état fondamental.

2. calibration du montage, méthode d'acquisition, suppression des artefacts

Longueur d'onde sonde (nm)	Temps de relaxation (ps)	Saut d'absorption
301	2.7 ± 1	0.0056
310	3.3 ± 1	0.019
318	5.4 ± 1	0.0089
332	3.1 ± 0.5	0.037
351	3.7 ± 1	0.04
355	5.2 ± 1	0.034

TABLE 5.2 – Temps de relaxation et amplitude du saut d'absorption dans le PYP après excitation par la pompe à 420 nm

5.3.2 Acquisition complète avec le Babinet-Soleil

Lors de cette expérience, nous mesurons à la fois la variation d'absorption et la variation de CD induites par la pompe.

L'amplitude et le signe du CD induit par la pompe constitue le résultat le plus impressionnant de cette expérience. Dans toutes les expériences où une variation de CD a pu être observée, on obtient un très fort pic négatif de CD juste après le passage de la pompe. Le CD relaxe ensuite vers sa valeur initiale en quelques picosecondes.

Dans tous les cas où une variation de CD a été observée, celle-ci suit la même dynamique que la variation d'absorption (voir figure 5.11).

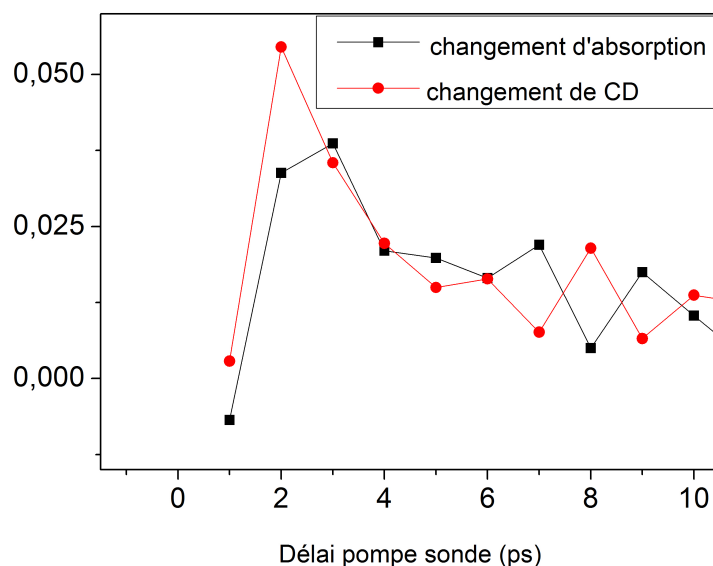


FIGURE 5.11 – Variations de l'Absorption et de la valeur absolue du CD (unités arbitraires) en fonction du retard pompe-sonde mesurées avec le Babinet-Soleil pour une sonde à 332 nm

De plus l'amplitude des sauts d'absorption et de dichroïsme circulaire dépend de la longueur d'onde sonde. Pour les deux grandeurs, cette dépendance est similaire (voir figure 5.12).

Ces résultats indiquent que le dichroïsme circulaire observé est issu des mêmes états électroniques que ceux sondés par absorption et donc bien de l'état excité du groupement carbonyle du

chromophore.

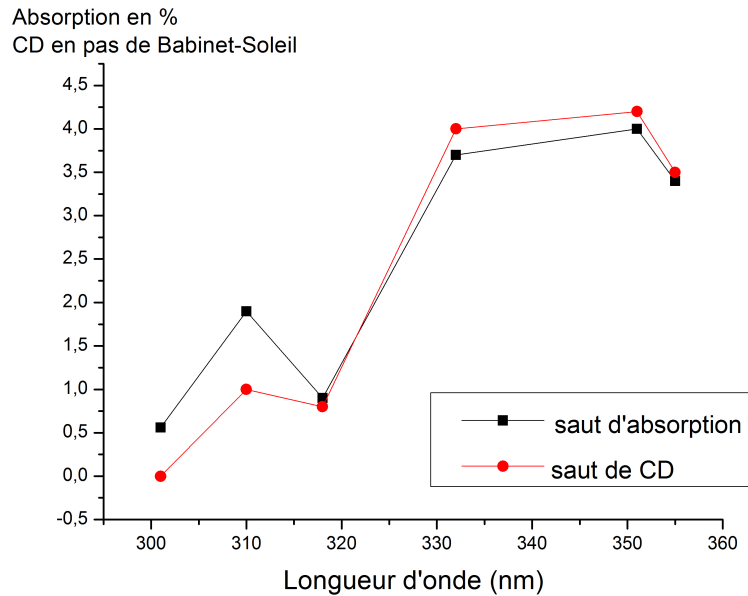


FIGURE 5.12 – Amplitudes des sauts d’absorption et de CD après la pompe en fonction de la longueur d’onde sonde

5.3.3 Absorption et CD de l’état excité

Connaissant le pourcentage de molécules excitées nous pouvons déduire de nos mesures les valeurs, aux différentes longueurs d’onde sondées, de l’absorption et du dichroïsme circulaire de l’état excité.

Avec ϵ la portion de molécules excitées, on peut écrire le dichroïsme circulaire avec et sans pompe comme suit :

$$CD_{\text{sans pompe}} = CD_{S_0} \quad (5.6)$$

$$CD_{\text{avec pompe}} = \epsilon CD_{S_1} + (1 - \epsilon) CD_{S_0} \quad (5.7)$$

Ainsi le changement de CD après excitation par la pompe s’écrit :

$$\delta CD = \epsilon (CD_{S_1} - CD_{S_0}) \quad (5.8)$$

Par le même raisonnement appliqué à l’absorption on obtient :

$$\delta \alpha l = \epsilon (\alpha_{S_1} - \alpha_{S_0}) l \quad (5.9)$$

Pour chaque longueur d’onde, nous sommes donc en mesure de calculer l’absorption et le CD de l’état excité à partir de nos mesures dynamiques et des spectres d’absorbance et de CD de notre échantillon. Les résultats de ce calcul sont regroupés dans le tableau 5.3.

On constate que le dichroïsme circulaire de l’état excité est négatif et jusqu’à 50 fois plus grand que le dichroïsme circulaire de l’état fondamental. Cela indique un grand changement dans l’environnement du groupement carbonyle, dû à la torsion du chromophore.

$\lambda(\text{nm})$	$\alpha_{S_0}l$	CD_{S_0}	$\delta\alpha l$	δCD	α_{S_1}	CD_{S_1}
301	0.4	5.10^{-4}	0.0056	0	0.48	5.10^{-4}
310	0.3	$5.7.10^{-4}$	0.019	$-2.5.10^{-4}$	0.59	$-3.2.10^{-3}$
318	0.3	$5.8.10^{-4}$	0.009	-2.10^{-4}	0.44	$-2.45.10^{-3}$
332	0.25	$2.7.10^{-4}$	0.037	-1.10^{-3}	0.81	-0.015
351	0.3	$1.4.10^{-4}$	0.04	-1.10^{-3}	0.91	-0.016
355	0.4	$1.6.10^{-4}$	0.034	$-8.7.10^{-4}$	0.92	-0.013

TABLE 5.3 – CD et absorption de l'état excité en fonction de la longueur d'onde calculés à partir des équations 5.8 et 5.9.

Nous allons essayer de déterminer, grâce à nos mesures et à la règle de l'octant, de quel angle le groupement carbonyle est tourné dans l'état excité, et si oui ou non le carbonyle est encore tourné dans l'état intermédiaire GSI.

5.4 Interprétation des résultats

5.4.1 Amplitude du saut de CD. Règle de l'octant

La cétone n'est pas un groupement intrinsèquement chiral car elle est plane. Or on peut observer un dichroïsme circulaire dans sa bande d'absorption. En effet, la géométrie des transitions électroniques du groupement cétone est très sensible à l'environnement de celui-ci, si bien que si la cétone est placée dans un environnement chiral, elle présentera un signal de dichroïsme circulaire.

La règle de l'octant

La règle de l'octant[54] a été formulée dans les années cinquante dans le but de pouvoir déduire des mesures de dichroïsme circulaire ou de rotation optique la configuration spatiale des cétones. Elle s'applique tout particulièrement à la transition électronique $n \rightarrow \pi^*$ autour de 290 nm.

Cependant, même si la cétone n'est pas reliée directement à une molécule chirale, on peut aussi utiliser la règle de l'octant pour déterminer la position d'autres molécules autour de la cétone.

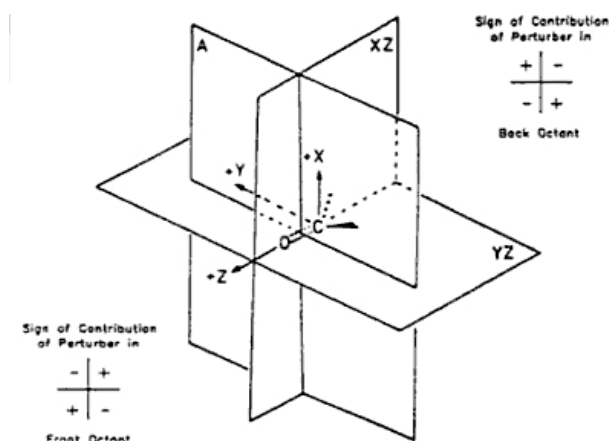


FIGURE 5.13 – Définition des octants et signe de la perturbation

L'espace autour de la cétone est divisé en 8 secteurs appelés octants (voir figure 5.13). L'occupation par une molécule perturbatrice de l'un ou l'autre octant détermine le signe de la perturbation qu'elle induit sur le CD.

Les trois plans qui définissent les octants sont des plans nodaux : un perturbateur se trouvant dans un de ces plans aura une contribution nulle au CD.

La contribution d'un perturbateur diminue avec la distance au chromophore, mais aussi avec la proximité d'un plan nodal. Un perturbateur très proche de la cétone verra sa contribution fortement affaiblie s'il est aussi proche d'un plan nodal.

En notant \vec{R}_{AC} le vecteur reliant le perturbateur à la cétone et (x,y,z) ses coordonnées, la contribution du perturbateur A au dichroïsme circulaire sera proportionnelle à [7] :

$$\Theta = \frac{-xyz}{R_{AC}^4} \quad (5.10)$$

Basculement de C=O

Grâce à la protein databank (PDB) nous avons accès à la structure en trois dimensions de la PYP (voir insert figure 5.14) et en particulier aux positions des acides aminés dominant le CD du carbonyle comme la cystéine 69. Nous pouvons donc calculer les positions des différents atomes par rapport à la cétone et en déduire leurs contributions au dichroïsme circulaire.

Pour calculer les variations de dichroïsme circulaire en fonction de l'angle de rotation de la cétone autour de l'axe de liaison C₂-C₃ grâce à l'équation 5.10 nous prenons en compte les contributions des atomes N69 et S69. Les contributions des atomes de carbone proches sont négligées par rapport à l'azote et au soufre car ils sont beaucoup moins polarisables.

On voit figure 5.14 que le dichroïsme circulaire à l'état fondamental, donc à angle nul, est positif et très faible. Expérimentalement nous observons un saut de dichroïsme circulaire pour l'état excité environ 50 fois plus grand en valeur absolue et négatif.

Nous ne pouvons pas directement appliquer la règle de l'Octant à l'état excité car celle-ci correspond aux états électroniques fondamentaux du groupement carbonyle. Il est donc difficile de déduire précisément de la valeur du CD dans l'état excité une valeur de l'angle de rotation de C=O. Cependant, d'après les trajectoires déterminées pour la photo-isomérisation de la protéine[55], cette rotation doit s'effectuer vers l'avant, si l'on se réfère à l'insert de la figure 5.14, ce qui correspond bien à un mouvement vers le fort pic de CD négatif calculé par la règle de l'octant. Ainsi, nous pouvons quand même estimer que l'état excité peut correspondre à une rotation d'environ 45° du groupement carbonyle. Lors d'une telle rotation, la distance entre C=O et S69 ne change pas beaucoup, ce qui préserve la liaison covalente avec la protéine.

D'après les données de la PDB on sait aussi que dans I₀ la liaison C=O a basculé de 180°. On voit figure 5.14 qu'une telle rotation n'induit pas un grand changement de dichroïsme circulaire.

Le saut de CD juste après excitation que nous observons nous amène donc à concevoir que le

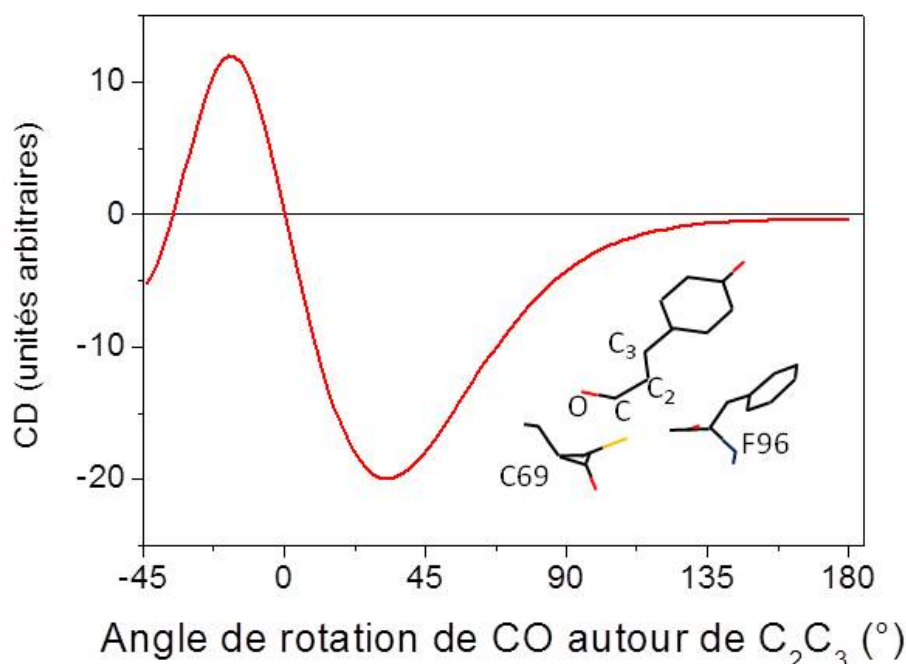


FIGURE 5.14 – Dichroïsme circulaire induit sur la liaison C=O par les perturbateurs N69 et S69 en fonction de la rotation de C=O autour de l'axe de liaison C_2 - C_3

groupement C=O effectue une rotation partielle dans l'état excité. Cette hypothèse est confirmée par les observations de F. Schotte et al. [56] qui montrent que la liaison C=O effectue une rotation de 90° dans le premier intermédiaire détecté du photocycle. Ce n'est que dans les étapes suivantes que la rotation s'accroît jusqu'à la position correspondant à une liaison C=C cis.

Grâce à nos observations nous comprenons aussi les conclusions de Van Wilderen et al. concernant l'étape clef d'entrée dans le photocycle[47] : en effet, si dans l'état excité la liaison C=O n'est tournée que d'environ 40° , on comprend que ce mouvement ne brise pas à coup sûr sa liaison hydrogène avec la Cys69, ce qui empêche d'entrer dans le photocycle dans 70 % des cas pour la PYP sauvage.

L'amplitude du saut de CD nous donne ainsi des informations qualitatives sur la structure supposée de l'état excité, même si l'application de la règle de l'Octant dans un état excité n'est pas forcément justifiée.

De plus, la décroissance du CD que nous observons après excitation n'est pas compatible avec une plus forte rotation de C=O dans l'état excité. En effet, l'état GSI est un état électronique fondamental pour lequel la règle de l'octant s'applique bien. Alors si nous imaginons un état excité très tordu, il faut envisager que GSI soit tordu lui aussi, ce qui ralentit la décroissance du CD par rapport à nos observations expérimentales (voir plus loin).

Grâce à la règle de l'octant nous pouvons interpréter la vitesse de décroissance du CD en la rattachant à la structure de GSI : nous allons dans la suite montrer que nos résultats ne sont pas compatibles avec un GSI dont le CD est égal à celui de l'état excité, ce qui signifierait un GSI dans lequel le carbonyle est tordu d'environ 20 à 45° .

5.4.2 Calcul des dynamiques d'absorption et de dichroïsme circulaire

Afin de pouvoir interpréter nos courbes de dynamique de dichroïsme circulaire nous avons effectué un calcul théorique à partir des équations de population des états de la protéine impliqués.

Description des états de la protéine

Les expériences menées par Larsen et al [51] ont permis d'établir un modèle cinétique de la photoexcitation du PYP montrant que l'état excité est en fait constitué de trois états excités différents. Deux modèles permettent d'ajuster les résultats expérimentaux :

- dans le modèle homogène, l'absorption d'un photon provoque la transition de l'état fondamental vers un premier état excité. Ce dernier relaxe vers GSI et vers un deuxième état excité. Qui fait de même vers un troisième état excité. Les trois états excités peuvent aussi relaxer vers I_0 et entrer dans le photocycle.
- dans le modèle hétérogène, la transition se fait simultanément vers les 3 états excités qui relaxent tous vers l'état fondamental via GSI ou vers I_0 .

Changenet-Barret et al[53] ont utilisé le modèle dit hétérogène établi par Larsen pour effectuer une analyse ciblée de spectres transitoires de la PYP. Cela leur a permis de déduire les taux de relaxation et les populations relatives des différents états du modèle.

Les différents états et taux de relaxation du modèle utilisés dans [53] sont expliqués dans la figure 5.15.

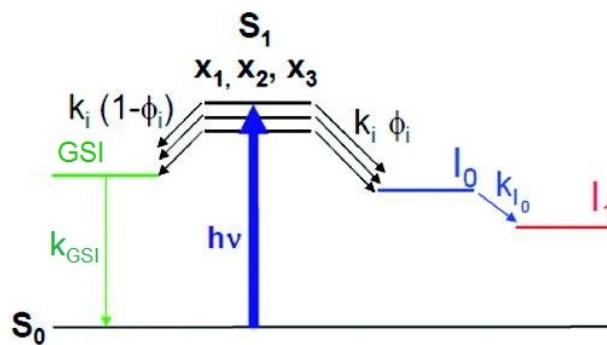


FIGURE 5.15 – Modèle cinétique utilisé pour l'analyse target de la PYP [53]. x_i sont les populations relatives des trois états excités S_1 . k_i sont les taux de relaxation de chaque état S_1 . Les rapports d'embranchement ϕ_i correspondent aux rendements de formation de l'intermédiaire I_0 à partir des états S_1 . De la même façon $(1-\phi_i)$ correspond aux rendements de formation de GSI à partir de S_1 . Le taux de formation de I_1 à partir de I_0 est noté k_{I_0} . Le rendement du processus $I_0 \rightarrow I_1$ est supposé égal à 1. Le taux de relaxation de GSI est noté k_{GSI}

Ce modèle nous a permis d'établir l'évolution temporelle des populations des différents états du PYP après excitation.

Equations des populations

A partir du modèle cinétique, nous pouvons écrire les équations régissant l'évolution des populations :

$$\frac{dN_{S_1}}{dt} = -k_i N_{S_1} \quad (5.11)$$

$$\frac{dN_{GSI}}{dt} = k_i(1 - \Phi_i)N_{S_1} - k_{GSI}N_{GSI} \quad (5.12)$$

$$\frac{dN_{I_0}}{dt} = k_i\Phi_i N_{S_1} - k_{I_0}N_{I_0} \quad (5.13)$$

$$\frac{dN_{S_0}}{dt} = k_{GSI}N_{GSI} \quad (5.14)$$

$$\frac{dN_{I_1}}{dt} = k_{I_0}N_{I_0} \quad (5.15)$$

En considérant qu'après excitation, seules 6.6 % des molécules ont été excitées, la résolution des équations précédentes nous donne l'évolution des fractions des populations des différents états de la PYP, définies comme $X = \frac{N}{N_0}$:

$$X_{S_1} = 0,066 \sum_{i=1}^3 x_i e^{-k_i t} \quad (5.16)$$

$$X_{GSI} = 0,066 \sum_{i=1}^3 \frac{k_i x_i (1 - \Phi_i)}{k_{GSI} - k_i} (e^{-k_i t} - e^{-k_{GSI} t}) \quad (5.17)$$

$$X_{S_0} = 0,934 + 0,066 \sum_{i=1}^3 \frac{k_{GSI} k_i x_i (1 - \Phi_i)}{k_{GSI} - k_i} \left[\frac{1 - e^{-k_i t}}{k_i} + \frac{e^{-k_{GSI} t} - 1}{k_{GSI}} \right] \quad (5.18)$$

$$X_{I_0} = 0,066 \sum_{i=1}^3 \frac{k_i \Phi_i x_i}{k_{I_0} - k_i} (e^{-k_i t} - e^{-k_{I_0} t}) \quad (5.19)$$

$$X_{I_1} = 0,066 \sum_{i=1}^3 \Phi_i x_i \left(1 + \frac{k_i e^{-k_{I_0} t} - k_{I_0} e^{-k_i t}}{k_{I_0} - k_i} \right) \quad (5.20)$$

Nous allons maintenant utiliser ces équations pour calculer l'absorption et le dichroïsme circulaire en fonction du délai pompe-sonde.

Expression de l'absorption et du CD

Pour calculer la variation d'absorption et de CD induits par la pompe en fonction du délai pompe-sonde, nous utilisons les paramètres cinétiques déduits des analyses target de [53] (tableau 5.4).

Nous établissons l'expression de la variation d'absorption :

$$\delta\alpha l = X_{S_1} \alpha_{S_1} l + (X_{S_0} - 1) \alpha_{S_0} l + X_{GSI} \alpha_{GSI} l + X_{I_0} \alpha_{I_0} l + X_{I_1} \alpha_{I_1} l \quad (5.21)$$

Avec $\alpha_{S_1} = \alpha_{exc}$ et $\alpha_{S_0} = \alpha_0$ donnés dans le tableau 5.3. D'après [53] l'absorption de GSI aux

longueurs d'ondes qui nous intéressent est environ un tiers de celle de S_1 et l'absorption de I_0 est égale à celle de S_0 . On peut ajouter que d'après [57] l'absorption de I_1 est aussi égale à celle de S_0 dans le domaine de longueurs d'ondes étudié.

Nous établissons de même l'expression du saut de CD :

$$\delta CD = X_{S_1} CD_{S_1} + X_{S_0} CD_{S_0} + X_{GSI} CD_{GSI} + X_{I_0} CD_{I_0} + X_{I_1} CD_{I_1} \quad (5.22)$$

Avec CD_{S_1} et CD_{S_0} donnés dans le tableau 5.3. Le CD de I_0 et I_1 est estimé à partir de la courbe figure 5.14 en considérant que dans ces états la rotation du groupement C=O est de 180° : alors $CD_{I_0} = CD_{I_1} = -1.3 CD_{S_0}$.

Pour le calcul du CD nous considérons deux cas distincts :

- si le carbonyle dans GSI a la même position que dans S_1 alors $CD_{GSI} = CD_{exc}$
- si le carbonyle dans GSI a la même position que dans S_0 alors $CD_{GSI} = CD_0$

Si les dynamiques de CD issues de ces deux cas diffèrent, et que l'une d'entre elle correspond aux résultats expérimentaux, nous pourrions conclure quant à la position du carbonyle dans l'intermédiaire GSI.

Populations relatives	Rapports d'embranchement	Taux de relaxation (ps^{-1})
$x_1 = 0.29 \pm 0.02$	$\Phi_1 = 0.63 \pm 0.08$	$k_1 = 1.3 \pm 0.1$
$x_2 = 0.44 \pm 0.01$	$\Phi_2 = 0.01 \pm 0.03$	$k_2 = 0.21 \pm 0.01$
$x_3 = 0.27 \pm 0.03$	$\Phi_3 = 0.01 \pm 0.03$	$k_3 = 0.038 \pm 0.001$
		$k_{GSI} = 0.27 \pm 0.02$
		$k_{I_0} = 0.0019 \pm 0.0002$

TABLE 5.4 – Paramètres du modèle cinétique pour le mutant R52Q

5.4.3 Résultats de la simulation et comparaison à l'expérience

Pour chaque longueur d'onde, nous avons effectué le calcul du saut CD et d'absorption d'après les équations 5.21 et 5.22 et avec les paramètres cinétiques du tableau 5.4 et les valeurs de CD et d'absorption pour chaque état déterminées plus haut.

Nous obtenons des courbes de l'allure donnée figure 5.16. Ces courbes peuvent être ajustées de manière approchée avec une fonction exponentielle décroissante, comme nous l'avons fait avec les courbes expérimentales, et nous en déduisons les constantes de temps de l'évolution du CD et de l'absorption pour les différentes longueurs d'onde.

A 301 nm nous n'observons pas de changement de CD : nous ne faisons pas apparaître cette longueur d'onde dans les résultats.

Nous pouvons constater dans le tableau 5.5 que, quelle que soit la longueur d'onde, le temps de relaxation du CD dans le cas où l'on considère que GSI a le même CD que l'état excité est très long : de l'ordre de 9 ps. Ceci est en contradiction avec nos observations expérimentales (voir figure 5.17) : à toutes les longueurs d'onde auxquelles on a pu observer le saut de CD, celui-ci relaxe très rapidement (en 2 ou 3 ps) vers la valeur de départ.

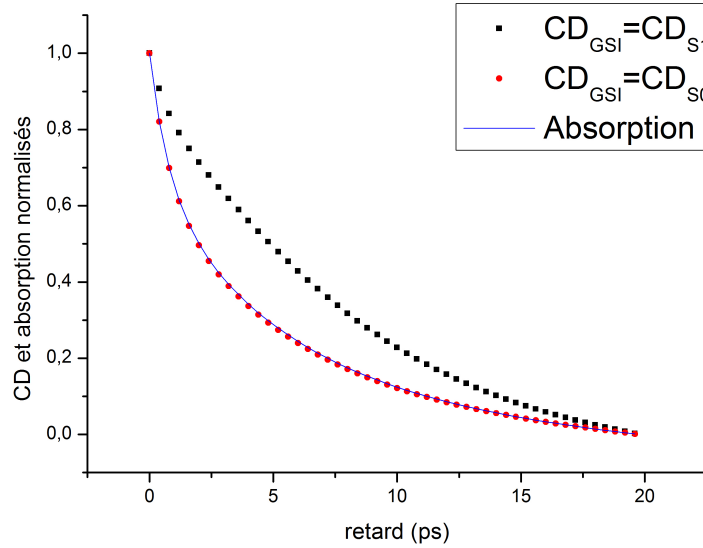


FIGURE 5.16 – Absorption et CD calculés à partir des équations des populations et du modèle cinétique. En noir le cas où le carbonyle dans GSI a la même position que dans S_1 . En rouge le cas où le carbonyle dans GSI a la même position que dans S_0 . En bleu l'absorption. Sur cette figure, absorption et CD sont normalisés pour varier entre 1 et 0 afin de faciliter la comparaison à l'œil des constantes de temps

λ (nm)	$\tau_{absorption}$ (ps)	$\tau_{CD_{GSI}=CD_{exc}}$ (ps)	$\tau_{CD_{GSI}=CD_0}$ (ps)
310	3.0	9.7	4.5
318	1.6	9.9	4.6
332	4.3	8.8	4.2
351	4.2	8.8	4.2
355	3.6	8.8	4.2

TABLE 5.5 – Résultats des ajustements exponentiels des calculs du CD et de l'absorption en fonction du retard pompe sonde

Le modèle utilisé par la simulation peut être d'autant plus validé lorsque l'on trace ensemble la simulation de l'absorption et le résultat expérimental (voir figure 5.18) : les deux tracés coïncident parfaitement sans besoin de normalisation car le calcul de $\delta\alpha$ est moins sujet au bruit que celui de δCD .

De cette simulation nous pouvons donc déduire que, dans l'état intermédiaire GSI, le carbonyle est revenu à sa position initiale.

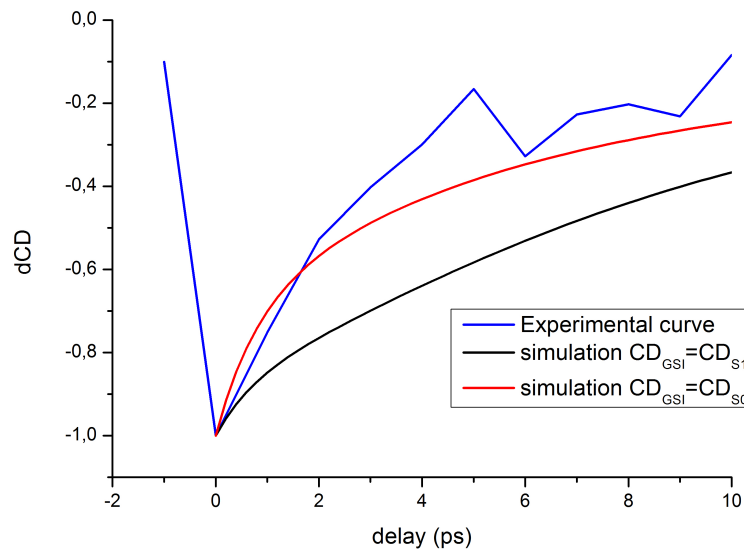


FIGURE 5.17 – Superposition des deux simulations de variation de CD et d’une courbe expérimentale pour une sonde à 332 nm. En bleue la courbe expérimentale, en rouge le cas où GSI a la même configuration que S_0 , en noir le cas où GSI a la même configuration que S_1 . Les courbes sont normalisées pour varier entre -1 et 0 afin de faciliter la comparaison des constantes de temps.

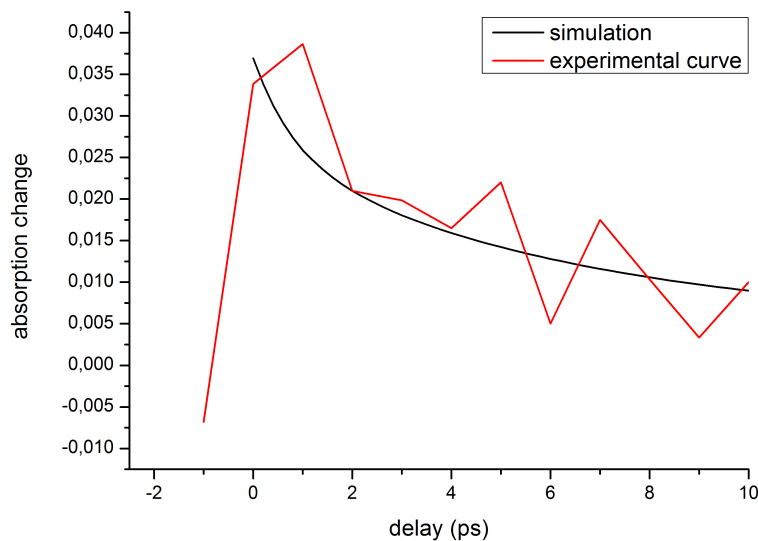


FIGURE 5.18 – Superposition d’une courbe expérimentale et de la simulation à 332 nm pour le saut d’absorption. Sans besoin de renormaliser les courbes se recouvrent très bien. Le saut d’absorption est sans unités.

5.5 Conclusion de l’expérience

La mesure du CD résolu en temps par la méthode du compensateur de Babinet Soleil est fastidieuse et donne des résultats très bruités. Cependant, son application à l’étude de la PYP nous a permis d’extraire d’importantes informations.

L’observation d’un grand saut de CD négatif instantanément après excitation et l’application de la règle de l’octant au groupement carbonyle du chromophore nous donne des indices inédits sur

l'amplitude de la rotation de ce groupement dans l'état excité. Cette rotation de près de 45° en moins d'une picoseconde n'a jamais pu être observée par les autres méthodes de spectroscopie.

Cette rotation, plutôt faible en comparaison de la position du groupement carbonyle après l'isomérisation trans-cis, explique pourquoi seules 30 % des protéines rentrent dans le photocycle : seules les molécules dont la rotation a été assez brutale pour rompre les liaisons hydrogène avec la Cys69 vont entrer dans le cycle.

De plus, le fait de mesurer le CD dans une gamme de longueurs d'onde dans laquelle les produits du photocycle absorbent peu (bien que pris en compte dans les simulations) nous permet de conclure quant à la position du groupement carbonyle dans l'intermédiaire GSI.

En ce qui concerne cette problématique, la dynamique du saut d'absorption ne donne aucune information puisque l'absorption ne dépend pas de la position de C=O. Seule la dynamique de CD nous a permis de conclure sur le fait que C=O a retrouvé sa position initiale dans l'intermédiaire GSI. Cela nous amène à penser que GSI a la même structure, ou une structure très proche, que l'état fondamental mais ses liaisons hydrogène ne sont pas revenues à leur état énergétique initial.

Chapitre 6

Mouvements des hélices alpha dans la bacteriorhodopsine

6.1 Les protéines à rétinol

La Bacteriorhodopsine fait partie de la famille des protéines à rétinol : ce sont des protéines transmembranaires qui permettent à des ions de traverser la membrane. Nous allons d'abord présenter les différents types de protéines transmembranaires, puis nous intéresser aux particularités des protéines à rétinol pour arriver à la description de la bacteriorhodopsine.

6.1.1 Les protéines membranaires

La membrane cellulaire est constituée d'une double couche de lipides à laquelle sont accrochées de nombreuses protéines[4]. Cette double couche lipidique est imperméable aux molécules polaires et aux ions. Or le fonctionnement de la cellule nécessite souvent l'échange de molécules entre l'intérieur et l'extérieur du cytosol : par exemple un échange d'ions est nécessaire pour générer un potentiel d'action le long de l'axone d'un neurone.

C'est pourquoi les protéines de transport transmembranaire sont d'une haute importance dans le fonctionnement de la cellule. On peut voir figure 6.1 la structure de la membrane cellulaire et les protéines qui y sont attachées.

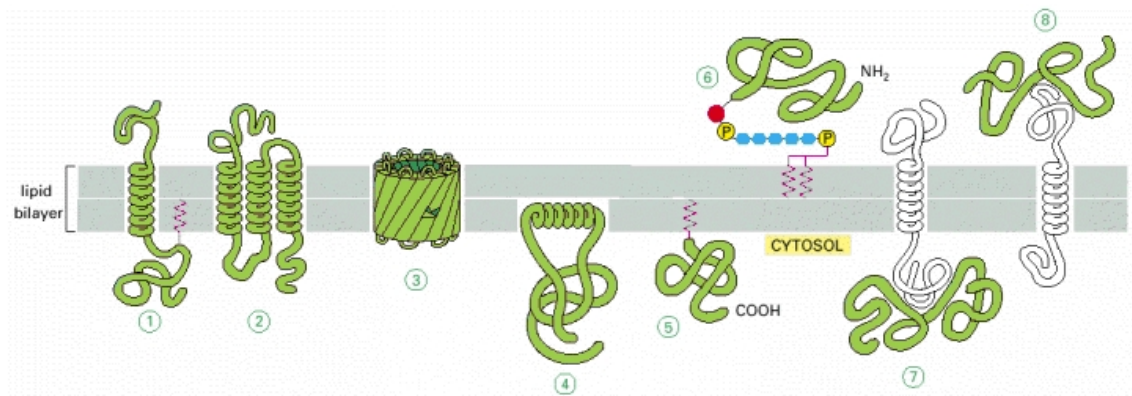


FIGURE 6.1 – Les différents types de protéines membranaires : certaines traversent la membrane et constituent des pores ou des pompes, d'autres ne se trouvent que d'un seul côté

Il existe deux types de protéines de transport :

- Les canaux ioniques (transport passif) : ces protéines ouvrent ou ferment un port à travers la membrane et les ions les traversent spontanément en suivant la différence de potentiel électrochimique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Elles ne sont pas toujours ouvertes. L'ouverture du port peut être activée par fixation d'un ligand, par une contrainte mécanique induite par une autre protéine ou par changement du potentiel électrique de la membrane.
- Les pompes et les transporteurs (transport actif) : Ces protéines sont capables de faire traverser la membrane à un ion ou une molécule contre son gradient de potentiel électrochimique. Elles nécessitent donc un apport d'énergie pour effectuer le transport : hydrolyse de l'ATP ou absorption d'un photon ; ou effectuent un co-transport nécessitant l'existence préalable d'un gradient de concentration d'un ion afin d'en transporter un second.

Ces deux types de transports sont parfois couplés.

6.1.2 Famille des rhodopsines

Les protéines à rétinol ou rhodopsines sont des pompes à ions possédant un chromophore appelé rétinol (figure 6.5(A)). Le rétinol est une des nombreuses formes de la vitamine A. La famille des rhodopsines se divise en deux familles distinctes : les rhodopsines visuelles (que l'on trouve dans la rétine) et les rhodopsines archaïques (présentes dans les bactéries halophiles)[58].

Les deux familles de protéines n'ont pas de séquences homologues, cependant elles ont des structures spatiales très comparables caractérisées par 7 hélices transmembranaires au milieu desquelles est accroché le rétinol : il est lié à la 7ème hélice via une base de Schiff (groupement $-CH=N-$) protonée.

Dans tous les cas, l'absorption d'un photon va provoquer l'entrée dans un photocycle aux échelles de temps très longues (millisecondes, secondes).

Les rhodopsines de la vision

Les rhodopsines de la vision sont d'importants photosenseurs présents dans les yeux de tout le règne animal.

Rappelons que la rétine est constituée de deux types de cellules :

- les cônes sont sensibles aux lumières intenses et aux couleurs, il y en a 3 types correspondant aux trois couleurs primaires de la lumière (vert, rouge et bleu)
- les bâtonnets ne sont pas sensibles à la couleur et permettent de détecter de faibles intensités lumineuses : c'est dans ces cellules que se trouvent les rhodopsines

Dans le processus de la vision (voir figure 6.2) , le changement conformationnel de la rhodopsine induit par l'absorption d'un photon va provoquer la fermeture d'un canal ionique à Na^+ . Le changement de concentration en ions sodium va alors hyperpolariser la membrane, ce qui inhibe l'émission de neurotransmetteurs. Ces neurotransmetteurs étant eux-même inhibiteurs des neurones post-synaptiques, cela revient à exciter le neurone post-synaptique et transmettre un signal au cerveau.

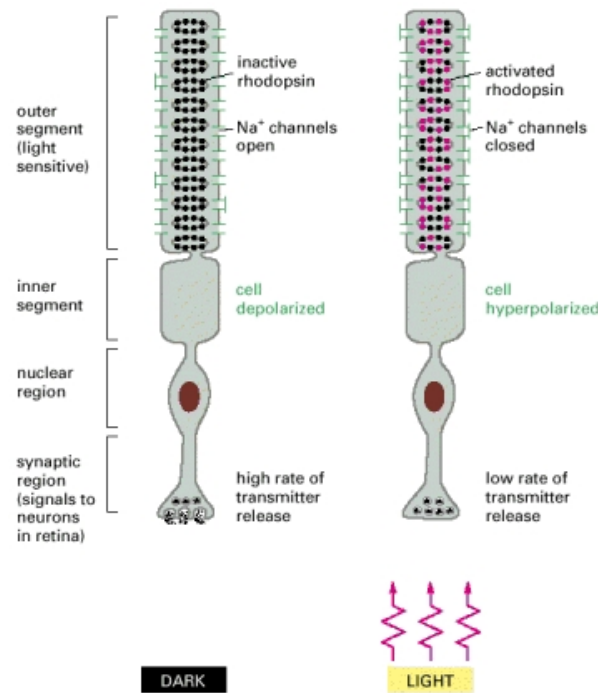


FIGURE 6.2 – Action de la lumière sur un batonnet

La rhodospine est donc à la base de la détection de la lumière.

Elle peut être aussi impliquée dans la gestion des cycles circadiens[59].

Les rhodopsines archaïques

Les rhodopsines archaïques sont des protéines des bactéries halophiles[60] c'est à dire les bactéries qui vivent dans les milieux extrêmement salins (jusqu'à 5 mol.L^{-1} de NaCl). Ces bactéries archaïques sont capables d'effectuer une forme ancienne de photosynthèse n'impliquant pas de chlorophylle[61]. Deux types de protéines sont impliquées respectivement dans la photosynthèse et la respiration des bactéries halophiles : les rhodopsines et les caroténoïdes. Elles constituent respectivement les membranes pourpres et les membranes rouges de la bactérie.

Ces bactéries sont responsables de la coloration rose des eaux très salées.

En présence d'oxygène, la bactérie absorbe directement la molécule grâce aux caroténoïdes et évite la lumière (voir figure 6.3).

Si elle se trouve confrontée à un manque d'oxygène, une méthode alternative de production d'ATP va se développer. La bactérie va être attirée par les zones lumineuses. La membrane pourpre, porteuse des rhodopsines va se développer. Ces rhodopsines ont différents rôles [61] :

- La bacteriorhodopsine agit comme une pompe à proton photoactivable. L'établissement d'un gradient de protons va entraîner la production d'ATP par l'ATP-synthase
- L'halorhodopsine agit comme une pompe à ions chlorure, pour maintenir la neutralité du milieu intra cellulaire
- deux rhodopsines sensorielles sont responsables de la recherche ou de l'éloignement de la lumière

Ainsi les halobactéries utilisent la lumière comme déclencheur de la production d'ATP, ce qui est bien une forme de photosynthèse.

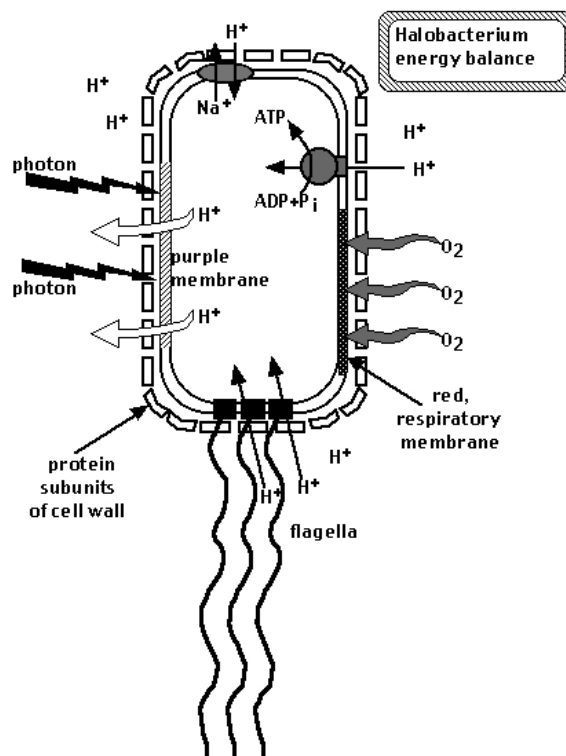


FIGURE 6.3 – Gestion de l'énergie dans une halobactérie

6.2 La bacteriorhodopsine

La bacteriorhodopsine est une protéine très étudiée depuis 30 ans[62], des milliers d'articles ont été publiés à son sujet et des conférences lui sont dédiées. Cette protéine est importante car elle constitue un modèle simple pour les récepteurs membranaires appelés protéines G (dont font partie la plupart des protéines cibles des drogues). De plus c'est un prototype de transport membranaire, mécanisme fondamental pour la vie des cellules.

6.2.1 Structure

La structure de la bacteriorhodopsine a été résolue par cristallographie électronique en 1975[63].

Comme toutes les rhodopsines, la bacteriorhodopsine est constituée de 7 hélices alpha transmembranaires (voir figure 6.4). Le rétinale est relié à l'hélice 7 par sa base de Schiff. A l'état fondamental, le rétinale est tout-trans (voir figure 6.5) et la base de Schiff est protonée.

Comme dit plus haut, la fonction de la bacteriorhodopsine est de transférer un proton de l'intérieur à l'extérieur de la cellule. Nous allons maintenant détailler le photocycle qui permet ce transfert.

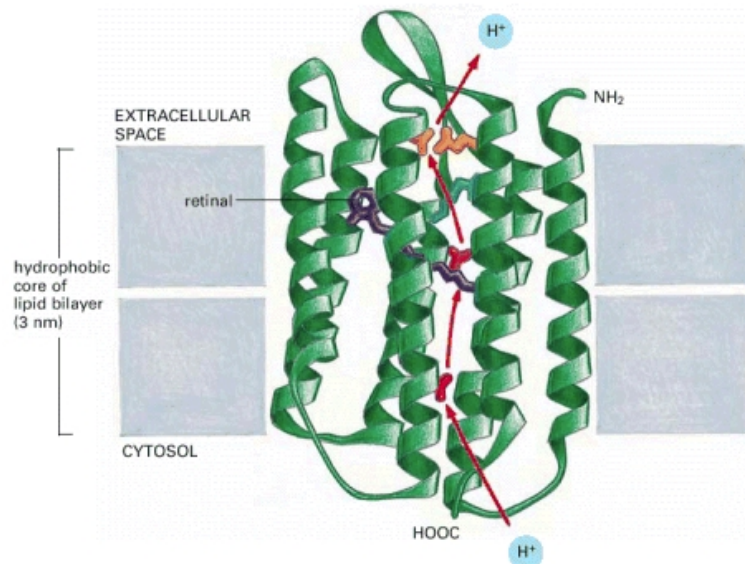


FIGURE 6.4 – Structure en 3 dimensions de la bacteriorhodopsine à travers la membrane cellulaire [4]

6.2.2 Photocycle

Après absorption d'un photon par le rétinale, la bacteriorhodopsine entre dans un photocycle : la protéine et le chromophore subissent un enchaînement de changements conformationnels.

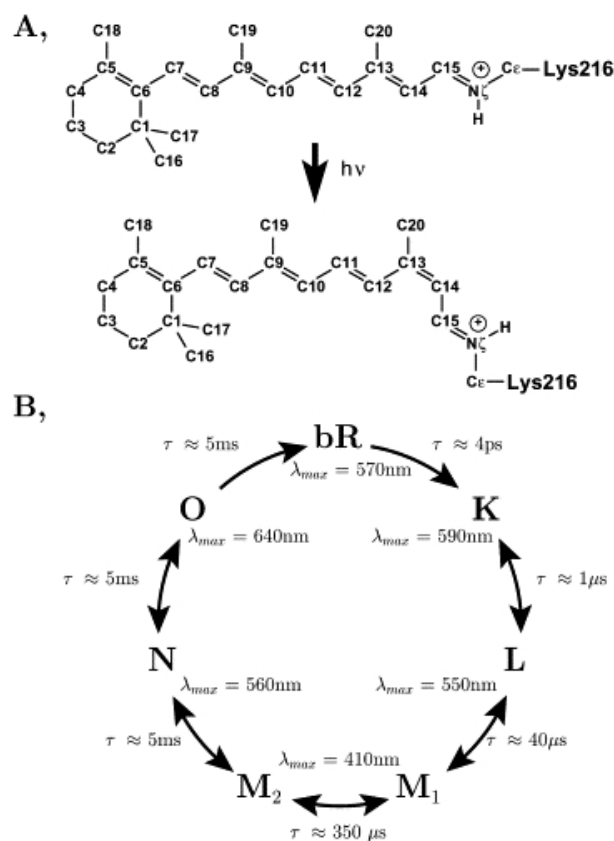


FIGURE 6.5 – (A) Le rétinale est lié à la protéine via une liaison covalente avec la Lys216. Cette liaison met en jeu la base de Schiff protonnée. Après absorption d'un photon le rétinale tout-trans s'isomérise dans la configuration 13-cis. (B) Les différentes étapes du photocycle de la bacteriorhodopsine. [64]

Forme adaptée à la lumière

Lorsque la bacteriorhodopsine est soumise à une illumination, le chromophore adopte la structure tout-trans. Alors si ce dernier absorbe un photon, le photocycle effectif, avec transfert de proton à travers la membrane, peut avoir lieu. On appelle cette forme de la bacteriorhodopsine forme "adaptée à la lumière".

Cependant, si la bacteriorhodopsine est gardée dans l'obscurité, un équilibre conformationnel s'établit entre deux structures du chromophore [65] : tout trans, et 13-cis 15-cis. A l'équilibre, une solution de bacteriorhodopsine va présenter les deux formes du chromophore en égales quantités.

La forme 13-cis 15-cis peut absorber un photon. Mais l'absorption d'un photon ne mènera pas à un photocycle fonctionnel : aucun proton n'est transféré à travers la membrane. Cette forme est la forme non adaptée à la lumière.

Pour être sûr d'avoir une solution de bacteriorhodopsine adaptée à la lumière, nous plaçons la cuve pendant plusieurs heures sous une lampe blanche avant de procéder à une mesure pompe-sonde.

Détails des étapes

Le photocycle se décompose en étapes bien déterminées :

bR→K : L'absorption d'un photon à 570 nm par le rétinal provoque l'isomérisation du rétinal de tout-trans à 13-cis et la déprotonation de la base de Schiff[66].

L→M : Le proton est transféré de la base de Schiff à l'Asp85. Le maximum d'absorption de la base de Schiff est maintenant à 410nm.

Simultanément à la formation de l'intermédiaire M, un proton est libéré dans le milieu extracellulaire par le groupement PRC (proton release complex) constitué de Glu194, Glu204, Arg82[67] et de molécules d'eau[64][66].

Il est reconnu que l'intermédiaire M est en fait constitué de deux étapes M1 et M2 qu'on ne distingue pas en spectroscopie[68][69]. D'après de précédentes études, c'est lors de la transition M1→M2 qu'un grand changement conformationnel a lieu sur la face cytoplasmique de la protéine, permettant de changer l'accessibilité de la base de Schiff[70]. Dans M1 la base de Schiff est connectée avec le milieu extracellulaire tandis que dans M2 elle ne peut interagir qu'avec le milieu intracellulaire. Cette étape est primordiale pour l'unidirectionnalité du transfert de proton[69].

M2→N : Le mouvement de la protéine et de la base de Schiff permet la reprotonation de cette dernière par Asp96.

N→O : le résidu Asp96 est reprotoné grâce à la capture d'un proton du cytoplasme. Cette étape est accompagnée de l'isomérisation du rétinal de 13-cis vers tout-trans.

Dans la dernière étape, un proton est transféré en interne entre Asp85 et le PRC pour rétablir l'état de protonation initial.

Tous ces transferts de protons sont accompagnés de fortes variations des pKa des différents résidus impliqués, permettant la favorisation ou la défavorisation des réactions acide-base. En particulier,

l'isomérisation *cis-trans* du rétinol permet de changer le pKa afin de décrocher le proton[71].

Les constantes de temps des différentes étapes sont résumées figure 6.5.

Changements conformationnels

Dans notre étude, nous nous intéressons aux mouvements de la protéine au cours du photocycle. Les distortions et isomérisations du rétinol sont bien connues et mesurées, cependant les mouvements du reste de la protéine ne sont pas prouvés et les études se contredisent parfois (les résultats de diffraction par rayons X de l'intermédiaire M[70] ne donnent pas les mêmes conclusions que les mesures par cryo-microscopie électronique[72][73]).

Un schéma du mouvement des hélices α de la bacteriorhodopsine au cours du photocycle semble cependant émerger(voir figure 6.6). Il apparaît alors que la plus grosse torsion des hélices alpha a lieu dans l'intermédiaire M2. L'intermédiaire L a lui aussi une hélice un peu tordue, l'hélice C.

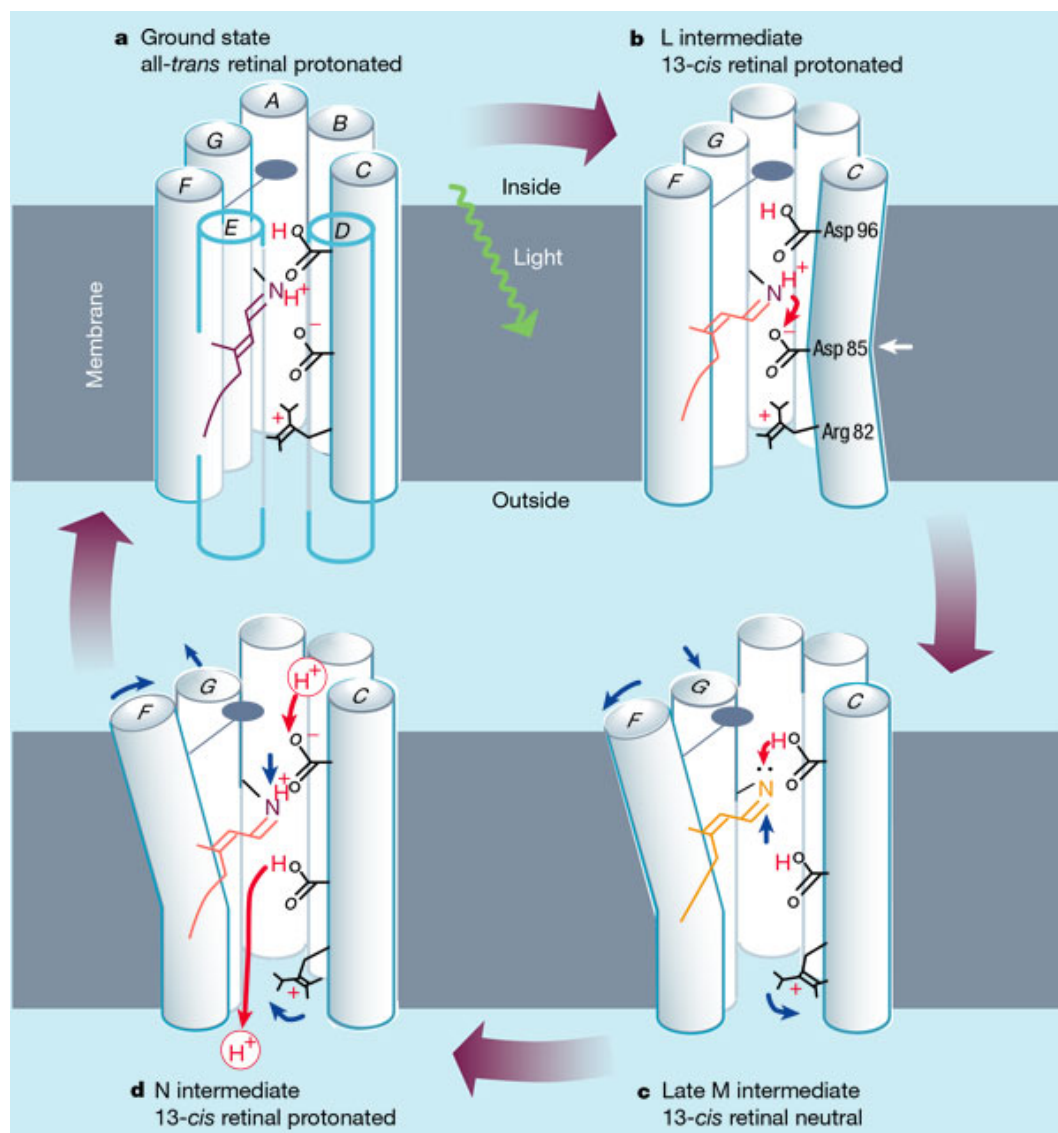


FIGURE 6.6 – Représentation de la structure de la bacteriorhodopsine au cours des étapes du photocycle[62]. Les hélices F et G subissent une torsion dans l'intermédiaire M. L'hélice C se plie légèrement dans l'intermédiaire L

La figure 6.6 n'indique par si l'intermédiaire M1 est lui aussi distordu.

Nous espérons que ce mouvement des hélices modifie assez le dichroïsme circulaire pour pouvoir le mesurer. S'il s'avère que l'intermédiaire M1 a des hélices tordues, nous devrions observer un changement de dichroïsme circulaire avec une constante de temps de 40 μs . Si la torsion n'intervient qu'entre M1 et M2 nous ne devrions pas voir de changement de CD avant plusieurs centaines de microsecondes.

Notons que le changement de dichroïsme circulaire induit par ce mouvement sera très faible en comparaisons de ceux mesurés dans le PGA par exemple : ici nous ne voulons mesurer qu'une torsion d'une ou de plusieurs hélices, alors que dans le PGA nous avons mesuré le dépliement d'une grosse partie d'une hélice.

6.3 Montage expérimental et résultats

6.3.1 Montage

Le montage expérimental de l'expérience pompe sonde est le même que pour le T-jump à l'exception que le faisceau du laser Nd-YAG ne passe pas dans l'OPO mais est utilisé directement pour pomper l'échantillon (voir figure 3.1).

Le laser pompe étant très intense il est nécessaire de mettre des filtres pour éviter de détruire trop vite l'échantillon[74].

Nous n'utilisons pas le laser pompe à sa puissance maximale mais seulement au niveau 2 sur 10. Il est ensuite atténué par un filtre NG3 qui divise l'intensité par 100. Nous obtenons une puissance de 3mW avant le filtre soit des impulsions ayant une énergie de 1 μJ au niveau de l'échantillon.

La solution de bacteriorhodopsine, préparée au laboratoire (voir annexe C), est placée dans une cuve de 1 mm de longueur. Cette cuve est placée sur un support en rotation et translation verticale afin d'éviter la décantation et la dégradation trop rapide de l'échantillon par la pompe.

Pour aligner ensemble les faisceaux pompe et sonde nous utilisons un échantillon de fuchsine qui présente un très fort signal pompe sonde visible directement à l'oscilloscope. L'optimisation de ce signal dans une cuve de fuchsine placée au même endroit que l'échantillon permet de s'assurer une bonne superposition des faisceaux.

6.3.2 Résultats

Comme attendu, la mesure de variation de dichroïsme circulaire dans la bactériorhodospine s'est révélée très fastidieuse : le saut de CD sort du bruit environ une mesure sur deux. Le saut d'absorption, même en moyennant sur de nombreuses acquisitions, reste très bruité.

Cependant, en faisant la moyenne de toutes les courbes d'absorption, et la moyenne des quelques mesures pour lesquelles un saut de CD ressortait, nous obtenons les courbes présentées figure 6.7.

La courbe d'absorption peut être ajustée par la fonction 4.17 pour prendre en compte le temps de réponse du système (voir figure 6.7), et l'on trouve une constante de temps de 12 μs .

Si l'on trace une exponentielle décroissante de constante de temps 12 μs sur la courbe de CD, et en ajustant son amplitude, on trouve que les deux courbes coïncident bien.

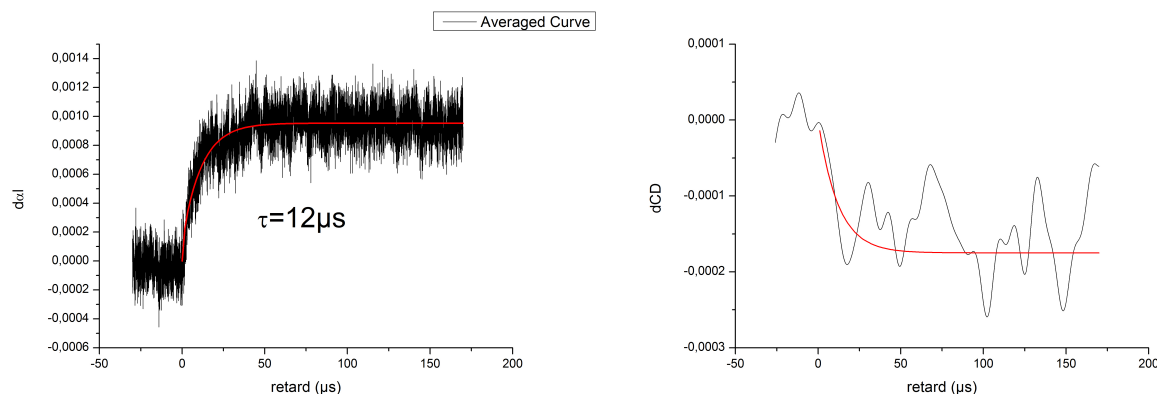


FIGURE 6.7 – Variation d’absorption (sans unité), à gauche, et de CD (filtrée par FFT, sans unité), à droite, après excitation de la Bacteriorhodopsine par une impulsion à 532 nm.

De plus, nous n’observons pas d’autre changement de dichroïsme circulaire sur des échelles de temps plus longues.

Nous pouvons donc déduire de nos mesures qu’il existe une dynamique conformationnelle dans la Bacteriorhodopsine après excitation du chromophore : cette dynamique a lieu sur une échelle de la dizaine de microsecondes et concerne les hélices alpha qui sont la structure sondée à 220 nm.

6.4 Interprétation

Le changement de dichroïsme circulaire que nous avons mesuré intervient sur une échelle de temps de l’ordre de la dizaine de microsecondes.

Cette mesure montre, en opposition avec de précédents résultats[70], qu’un changement conformationnel a lieu dans les hélices alpha avant la transition M1 vers M2.

En effet, l’échelle de temps que nous mesurons est légèrement plus courte que celle associée à la transformation L vers M1 (voir figure 6.5). Nous pouvons alors envisager que des torsions des hélices ont lieu à la fois dans L et dans M1 et que l’échelle de temps observée se situe entre les constantes de temps de formation de ces deux intermédiaires.

Nous pouvons néanmoins confirmer que l’intermédiaire M1 doit avoir une configuration dans laquelle les hélices sont tordues, bien avant la formation de M2.

Rappelons que dans l’expérience de saut de température sur le PGA nous avons mesuré des changements de dichroïsme circulaire de l’ordre de 4.10^{-4} correspondant à un dépliement de 2.7 % en fraction d’hélice. Ici nous mesurons un saut de CD plus de deux fois plus petit, environ $1,7.10^{-4}$, ce qui correspond à une très petite variation d’hélicité que l’on peut relier à la torsion d’une ou plusieurs hélices.

Nous ne pouvons pas aller plus loin quantitativement car il faudrait pouvoir calculer la relation entre le CD et la torsion d’une hélice.

Quatrième partie

Conclusion

Conclusion

La compréhension des mécanismes internes des protéines est essentielle pour la compréhension du monde vivant dans son ensemble. Ces mécanismes sont à la base de fonctions fondamentales d'un être vivant, et leur défaillance peut provoquer des maladies qu'on ne sait pas toujours soigner.

Lors de ce travail de thèse nous avons étudié différents aspects des changements conformationnels pouvant avoir lieu dans les protéines.

L'étude du dépliement du PGA constitue un pas vers l'élucidation du repliement des protéines et nous permet de mettre en exergue la complexité d'un tel phénomène. De plus la mise en avant des complications liées à l'utilisation de l'eau ou de l'eau lourde comme solvant pose des questions sur la validité de mesures effectuées par des méthodes Infra-rouge.

Nous avons montré que le changement de solvant influe sensiblement sur la stabilité et la dynamique de repliement du PGA. Ainsi, à basse température, le dépliement est plus lent dans l'eau lourde que dans l'eau, et ce rapport s'inverse à haute température, indiquant un grand changement dans la thermodynamique du phénomène.

La différence entre l'eau et l'eau lourde n'est montrée que pour le repliement du PGA. Nous espérons pouvoir renouveler cette expérience pour l'étude d'autres polypeptides formant des hélices α , tels que la polyalanine, afin de vérifier si l'effet que nous avons observé est lié au caractère acide du PGA et à la dépendance de la constante d'acidité avec le solvant utilisé.

Bien qu'il ne s'agisse ici que de l'étude d'un mécanisme élémentaire, le repliement d'une hélice α , ces résultats nous permettent d'entrevoir la difficulté et les précautions à prendre dans le choix des méthodes expérimentales utilisées pour étudier le repliement des protéines. En effet, le repliement des protéines semble pouvoir être influencé par d'infimes changements de l'environnement.

L'étude de la PYP nous a permis d'utiliser une méthode de mesure du dichroïsme circulaire originale développée au LOB par Claire Niezborala et François Hache[15]. Cette technique, quoi que fastidieuse, montre la puissance de la mesure du dichroïsme circulaire par rapport à une mesure en absorption.

A l'aide de notre mesure pompe-sonde nous avons déduit la dynamique de relaxation du CD après excitation du chromophore de la PYP. Cette relaxation s'effectuant en quelques picosecondes, nous avons pu en déduire que le chromophore dans l'intermédiaire GSI par lequel l'état excité relaxe vers l'état fondamental, a nécessairement la même structure spatiale que dans l'état fondamental. Au contraire, la relaxation de l'absorption ne nous permettrait pas de discriminer les deux hypothèses faites concernant la structure du chromophore dans l'intermédiaire GSI.

Grâce au dichroïsme circulaire nous avons donc déduit des résultats inédits sur le comportement du chromophore dans le photocycle de la PYP. Cela montre que, même si le dichroïsme circulaire est une grandeur difficile à mesurer, on peut en tirer de grandes informations et il est nécessaire de continuer à développer les méthodes qui l'utilisent.

La mesure de la dynamique du dichroïsme circulaire dans la bacteriorhodopsine n'est ici qu'une ouverture. Le signal, très faible, donne seulement des informations qualitatives quant au moment où

le changement conformationnel a lieu dans les hélices alpha de la protéine.

Nous avons observé un petit saut de dichroïsme circulaire sur un temps de 12 microsecondes. Ce résultat indique qu'un changement de la conformation des hélices α de la protéine a lieu avant l'étape déterminante M1 vers M2 pendant laquelle l'accessibilité de la base de Schiff bascule.

Ainsi, même si cette étape est déterminante dans le transfert de proton, un mouvement des hélices a lieu bien avant.

Cependant, notre mesure très qualitative ne nous permet aucunement de dire quelle hélice bouge, ni quelle est l'amplitude du mouvement.

Pour aller plus loin on pourrait faire la mesure à d'autres échelles de temps, afin de tenter de voir si le dichroïsme circulaire subit d'autres changements, par exemple à l'échelle de la transformation M1 vers M2.

Toutes ces expériences ne sont qu'un début et nous invitons les futurs étudiants en thèse à appliquer ces systèmes expérimentaux à d'autres protéines ou molécules chirales. De plus les systèmes d'acquisition que nous avons utilisés ne sont pas parfaits (temps de réponse, bruit) et nécessitent l'apport de nouvelles améliorations afin de rendre la mesure du dichroïsme circulaire plus facile et précise.

Pour conclure, n'oublions pas que la mesure du dichroïsme circulaire résolu en temps est une méthode d'étude des protéines parmi d'autres. C'est souvent la complémentarité, le croisement des informations données par différentes méthodes, qui permet d'élucider pleinement un mécanisme de repliement.

Cinquième partie

Annexes

Annexe A : spectrophotomètre à dichroïsme circulaire

Motivations

Lors de nos expériences, nous soumettons les protéines à des rayonnements lasers impulsionnels intenses ainsi qu'à de brusques changements de température. Ces perturbations peuvent mener à un dépliement ou à une dénaturation des protéines étudiées. Il est donc nécessaire de pouvoir contrôler l'état de l'échantillon au cours d'une série d'expériences.

Mesurer le spectre d'absorption n'est souvent pas suffisant : par exemple, dans le cas d'une protéine à chromophore, il se peut que le chromophore soit intact mais la protéine dépliée, alors le spectre d'absorption peut rester inchangé.

Nous avons donc besoin d'un spectrophotomètre à dichroïsme circulaire afin de vérifier si la structure secondaire de la protéine est restée inchangée tout au long de l'expérience.

Les spectrophotomètres à dichroïsme circulaire sont des appareils rares et coûteux, nous avons donc décidé d'en mettre un au point.

Principe et mise en oeuvre

La mesure d'un spectre de dichroïsme circulaire nécessite :

- une source accordable en longueur d'onde
- la génération d'ondes polarisées circulairement droite et gauche
- une détection permettant de mesurer la différence d'absorption entre les deux types d'ondes

Nous nous intéressons principalement au dichroïsme circulaire relié aux structures secondaires des protéines, nous devons donc utiliser une source qui émet dans l'UV lointain. Nous avons choisi une lampe au Deuterium.

La sélection en longueur d'onde se fait à l'aide d'un monochromateur UV-visible.

Un modulateur photoélastique (PEM) précédé d'un polariseur linéaire permet la génération des ondes polarisées circulairement alternativement gauche et droite à une fréquence de 50 kHz.

La lumière traverse l'échantillon et est collectée par un photomultiplicateur. Le signal du PM est ensuite envoyé sur un amplificateur Lock-In afin de détecter l'amplitude de modulation du signal à 50 kHz.

Le signal lock-in est noté LI et est proportionnel à la différence d'intensité $I_d - I_g$.

On calcule le CD comme dans l'équation 2.11 soit :

$$CD = \sqrt{2} \frac{LI}{PM_{moyen}} \quad (6.1)$$

La $\sqrt{2}$ vient du fait que l'amplificateur lock-in renvoie la valeur RMS de la tension et non pas la valeur pic-pic.

L'ensemble du dispositif est dirigé par un programme Labview.

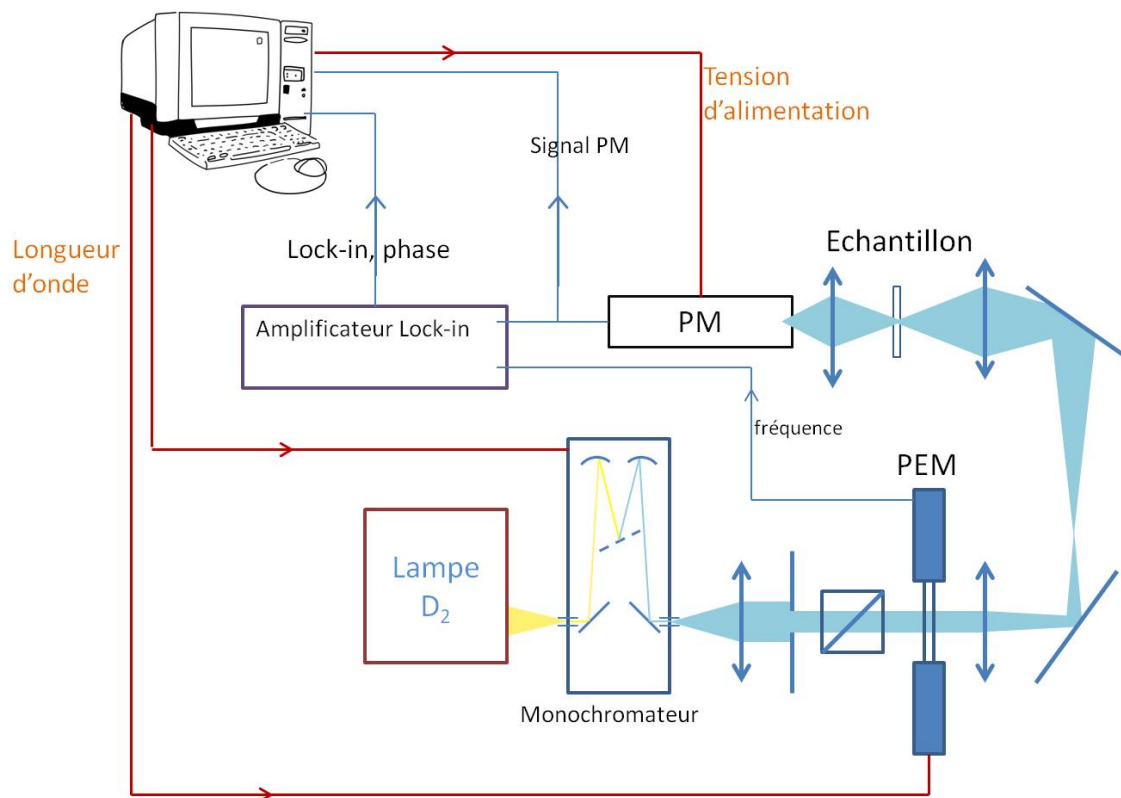


FIGURE 6.8 – Montage expérimental du spectrophotomètre à dichroïsme circulaire. Les flèches rouges représentent les ordres donnés par l'ordinateur, les flèches bleues la collecte des données.

Le montage est résumé sur la figure 6.8.

Le modulateur photoélastique

Pour générer les ondes polarisées circulairement droite et gauche nous avons besoin d'une lame anisotrope pouvant alterner entre la configuration +quart d'onde et -quart d'onde. L'utilisation de l'amplificateur lock-in est plus aisée à haute fréquence, on ne peut donc pas utiliser la cellule de Pockels comme dans l'expérience de T-jump car celle-ci a un temps de réponse assez long.

L'utilisation d'un modulateur photoélastique s'impose donc.

Le modulateur photoélastique repose sur le principe selon lequel une contrainte mécanique sur une lame de matériau isotrope va rendre cette lame anisotrope avec un axe orienté suivant la direction de la contrainte.

Le modulateur est constitué d'une lame de quartz à laquelle on accole un cristal piézoélectrique. Ce cristal est alimenté avec une tension sinusoïdale de fréquence égale à la fréquence de résonance de la lame. La vibration du cristal va engendrer de fortes contractions et dilatations de la lame parallèlement à la direction de vibration du cristal. En choisissant l'amplitude de la tension appliquée au piézoélectrique, on peut choisir quel est le déphasage introduit par une dilatation et une contraction pour une longueur d'onde donnée.

Ainsi, si le PEM est précédé d'un polariseur linéaire orienté à 45° de ses axes, qu'on choisit la tension pour que le retard introduit oscille entre $+\frac{\lambda}{4}$ et $-\frac{\lambda}{4}$, on obtient à la sortie une lumière dont la polarisation varie sinusoïdalement entre circulaire droite et circulaire gauche.

Les fréquences d'utilisation des PEMs varient entre 50 et 100 kHz selon le modèle, ce qui convient à l'utilisation d'un amplificateur lock-in.

Difficultés expérimentales

Les principales difficultés de ce montage expérimental sont issues de la nature de la source de lumière.

Nous disposons en effet d'une source peu intense et non ponctuelle. Par conséquent il est difficile d'obtenir un faisceau correctement parallèle sur tout le trajet.

On voit sur la figure 6.8 que le faisceau est approximativement parallèle au niveau du PEM puis qu'il subit plusieurs focalisations et défocalisations pour arriver dans l'échantillon puis au PM. Nous avons vérifié, grâce à un compensateur de Babinet Soleil, que la lumière est bien polarisée circulairement gauche et droite à la sortie du PEM.

A cause des nombreuses lentilles et de la détection par un photomultiplicateur, même sans échantillon, le signal de Lock-in n'est pas nul, et dépend de la longueur d'onde. Ceci peut être dû à la présence d'une légère anisotropie des lentilles et des fenêtres d'entrée du PM. Même si ce LI n'atteint que quelques pour mille du signal moyen, il est du même ordre de grandeur que le dichroïsme circulaire que nous souhaitons mesurer.

Il est donc nécessaire de faire un blanc avant chaque mesure. Nous avons dû chercher une position de l'échantillon qui permettait que le blanc fait sans la cuve soit identique au blanc fait avec une cuve vide. En effet, à la position choisie au départ, le signal LI dépendait fortement de l'orientation de la cuve, rendant la fiabilité du blanc très aléatoire et affectant ainsi la reproductibilité d'un spectre.

La position choisie et représentée sur le schéma est celle où l'orientation de la cuve n'a aucune influence sur la mesure du blanc. Ainsi nous pouvons avec confiance comparer deux mesures entre lesquelles la cuve a été enlevée, vidée, puis remise en place.

Spectres obtenus

Spectres du binaphthol

Le binaphthol est une petite molécule chirale au spectre de CD très caractéristique, avec un changement de signe du CD. Le spectre de cette molécule nous permet donc de tester si la valeur du zéro de notre appareil est fiable et si l'amplitude des variations de CD mesurées correspond aux valeurs attendues.

Nous présentons figure 6.9 le spectre du binaphthol obtenu grâce à un appareil commercial.

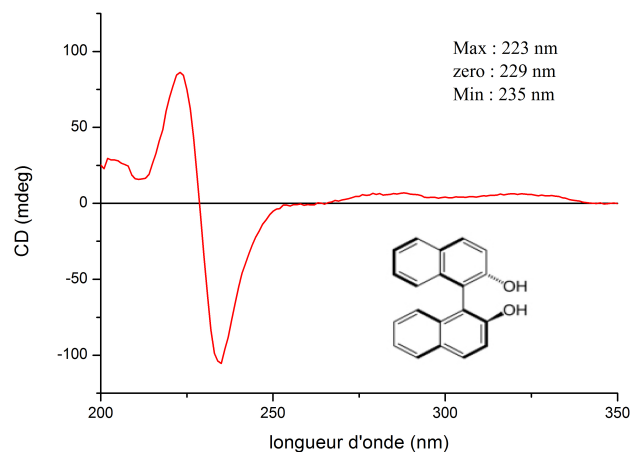


FIGURE 6.9 – La formule du binaphthol ainsi qu'un spectre de CD obtenu à l'IGR, Institut Gustave Roussy

Nous pouvons constater figure 6.10 que le spectre obtenu grâce à notre montage correspond très bien à celui obtenu avec un appareil commercial, les amplitudes relatives des pics positifs et négatifs sont celles attendues.

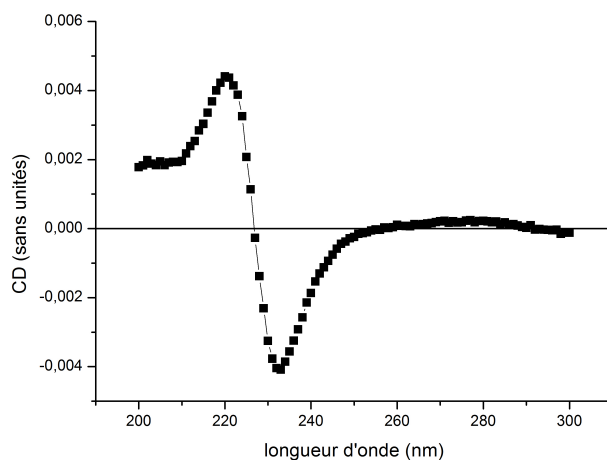


FIGURE 6.10 – Spectre de dichroïsme circulaire du Binaphthol obtenu avec notre appareil

Sachant que les signes des pics de CD sont inversés quand on passe d'un énantiomère du binaphthol à l'autre, notre montage nous permet par exemple de savoir quel énantiomère nous avons en solution.

Spectres du PGA

Nous avons principalement utilisé notre montage pour mesurer les spectres de CD du PGA en fonction de la température, mais aussi pour vérifier que l'échantillon était toujours bien replié après une campagne de T-jump.

L'allure d'un spectre de PGA neuf est présentée figure 6.11. Le pic à 220 nm est très marqué.

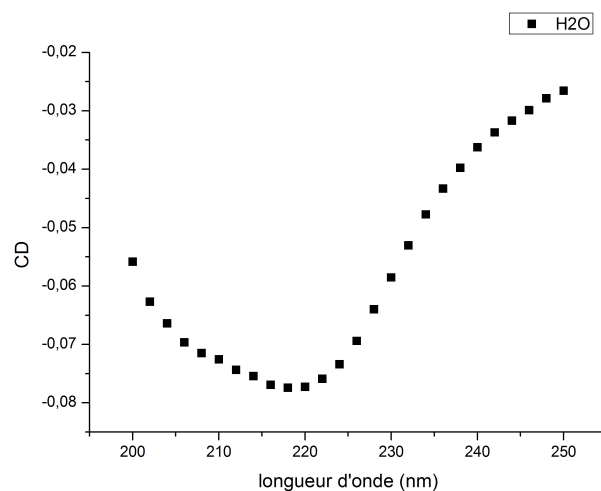


FIGURE 6.11 – Spectre du PGA fraîchement dilué dans l'eau et ajusté à un pH de 4,7

Au contraire, lorsque le PGA est détérioré, le pic caractéristique des hélices α à 220 nm s'efface comme sur la figure 6.12. Cette détérioration apparaît soit après soumission à plusieurs jours de T-jump, soit dans une solution de PGA vieille de plusieurs mois.

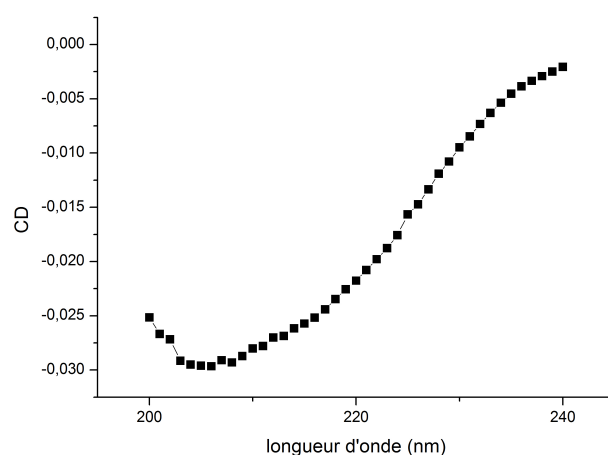


FIGURE 6.12 – Spectre du PGA détérioré

Ainsi nous avons un bon témoin de la qualité de nos échantillons.

Annexe B : T-jump dans le tampon d'acide acétique

La première campagne de mesure de T-jump dans le PGA a été effectuée avec des échantillons dont le pH était ajusté grâce à un tampon acide acétique/acétate de sodium.

Nous nous sommes ensuite aperçus de deux problèmes sur ces mesures : tout d'abord l'acide acétique et l'acétate de sodium absorbent dans l'UV lointain (voir figure 6.13). Ensuite, l'acide acétique étant un acide faible, son pKa dépend de la température : un T-jump va donc impliquer un changement de pH.

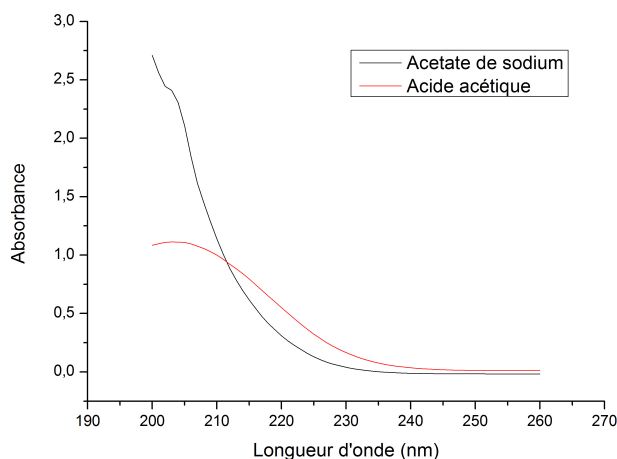


FIGURE 6.13 – Spectres d'absorption de l'acide acétique ($l=1$ mm $c=0.3$ M) en rouge et de l'acétate de sodium ($l=100$ μ m $c=1.5$ M) en noir

Nous présentons tout de même dans cette annexe les résultats obtenus lors de cette campagne de mesure, et leur exploitation.

Préparation de l'échantillon

Pour cette campagne de mesure nous avons préparé un grand volume d'échantillon qui a ensuite été gardé au réfrigérateur et utilisé pour renouveler la solution soumise au saut de température.

Pour cela nous avons dissout 100mg de PGA dans un mélange d'acide acétique et d'acétate de sodium à 0.05 mmol.L⁻¹ puis ajusté le pH par ajout d'acétate de sodium.

La solution ainsi obtenue a une concentration de PGA de 14.5 mg.ml⁻¹ pour un pH de 4.7.

Spectres de CD en fonction de la température

Nous avons mesuré les spectres de dichroïsme circulaire en fonction de la température de cette solution avec un appareil commercial à l'institut Curie (Université Paris Sud).

Des spectres présentés figure 6.14 nous pouvons extraire la courbe de fusion du PGA dans l'acide acétique, ainsi que sa dérivée en fonction de la température.

Nous pouvons constater que la courbe de fusion de cet échantillon est bien plus sigmoïdale que la courbe de fusion du PGA dans l'eau (voir figure 4.9) ce qui montre l'influence de la présence de l'acide acétique.

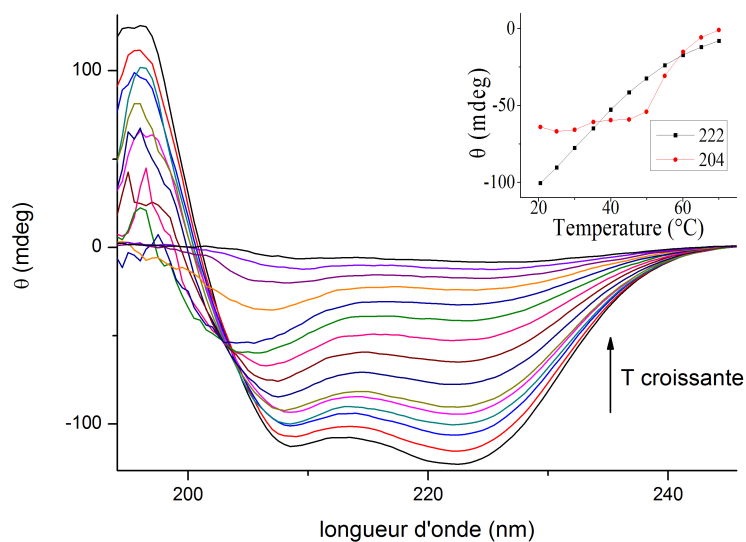


FIGURE 6.14 – Spectres de dichroïsme circulaire en fonction de la température du PGA dans un tampon d'acide acétique dans l'eau.

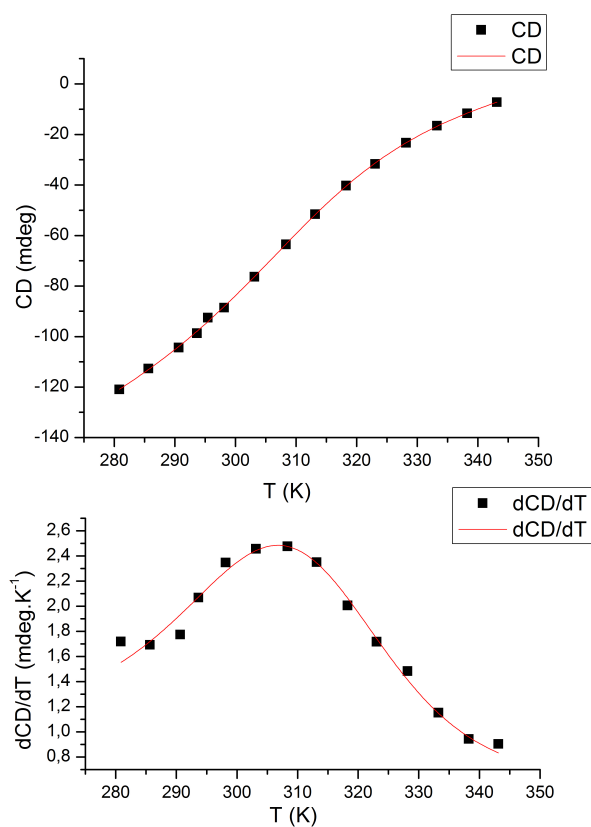


FIGURE 6.15 – Courbe de fusion du PGA dans l'acide acétique et sa dérivée. Les courbes rouges représentent l'ajustement par la méthode décrite partie 4.2

Cette courbe de fusion est utile pour évaluer le saut de température dans chaque expérience de T-jump à partir du saut de CD observé.

Saut de pH

Nous pouvons évaluer le saut de pH issu du saut de température dans une solution d'acide acétique connaissant la constante d'acidité K_a de l'acide acétique et sa variation avec la température.

D'après la relation isobare de Van't Hoff :

$$\frac{d\ln(K_a)}{dT} = \frac{\Delta H^\circ(T)}{RT^2} \quad (6.2)$$

Où $\Delta H^\circ(T)$ est l'enthalpie standard de la réaction acide base à la température T . A 25°C $\Delta H^\circ = -0.41 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

Si l'on considère la dissolution de l'acide acétique dans l'eau à une concentration de $C=0.05 \text{ mmol.L}^{-1}$ comme dans nos échantillons, nous pouvons calculer le pH à 25°C sachant que $\text{pK}_a(25)=4.756$. Si on considère l'avancement de la réaction de l'acide acétique avec l'eau, la constante d'équilibre K_a peut s'écrire (en négligeant les ions H^+ présents dans l'eau au départ) :

$$K_a = \frac{H^2}{C - H} \quad (6.3)$$

avec H la concentration en ions H^+ . On en déduit $H=2,21.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH}=4,655$.

Considérons maintenant que la température s'est élevée de 5°C , alors le pK_a est maintenant de 4.743. Le pH est alors égal à 4,651 il a donc diminué de 0,004.

Ce saut de pH paraît tout petit cependant si l'on effectue une expérience de T-jump dans une solution d'acide acétique à $\text{pH}=4.7$ on observe figure 6.16 un saut d'absorption issu de la différence d'extinction molaire entre l'acide acétique et l'acétate.

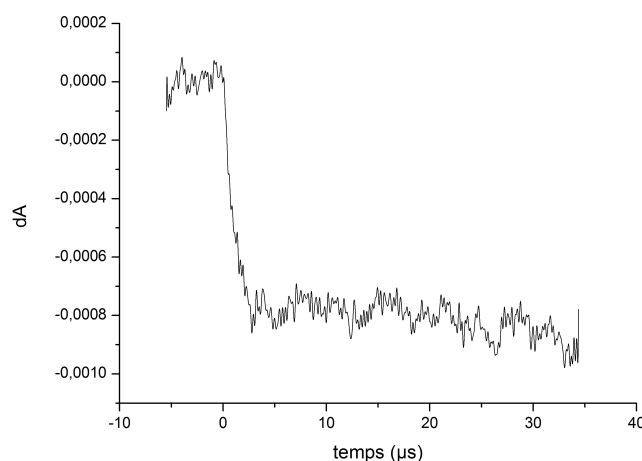


FIGURE 6.16 – Saut de température dans une solution d'acide acétique seul : le saut de pH est instantané, le temps de relaxation vient de la réponse RC du montage.

De plus, le PGA est lui aussi un acide faible dont le pK_a va dépendre de la température : lors d'un saut de température, il va se déprotoner et la nouvelle valeur de son pK_a va aussi influencer le pH global de la solution.

Résultats du T-jump

Nous avons ajusté les courbes de CD et d'absorbance par la même méthode que pour le PGA dans l'eau et dans l'eau lourde. Les temps issus de l'absorbance sont présentés sur la figure 6.17.

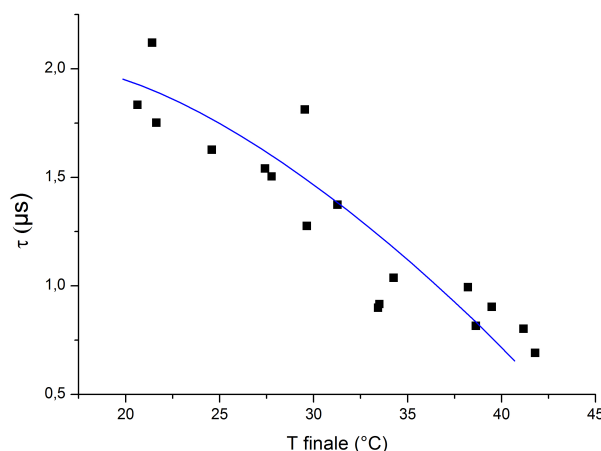


FIGURE 6.17 – Temps de relaxation obtenus dans le PGA dissout dans la solution d'acide acétique à pH=4.7. La courbe bleue montre la tendance décroissante.

Les temps de relaxation obtenus varient de 2 à 0.7 microsecondes ce qui est globalement plus lent que les temps obtenus dans l'eau (entre 1.5 et 0.6 μs). On pourrait penser que le dépliement est ralenti à cause de la présence de l'acide acétique : il se peut que l'équilibre entre l'acide acétique et le PGA fasse qu'à un même pH le PGA est plus protoné que dans l'eau seule.

Conclusion

Nous ne pouvons pas faire d'étude thermodynamique sur ces temps de relaxation car nous ne sommes pas en présence d'une simple variation de température du solvant. La réaction mise en jeu n'est plus seulement le dépliement du PGA mais aussi un échange d'ions H^+ avec l'acide acétique.

Nous pouvons conclure qu'il faut prêter une grande attention à la manière d'ajuster le pH quand celui-ci a une influence sur le dépliement que l'on veut observer. L'utilisation de la technique du saut de température impose d'utiliser un acide fort, dont le pKa ne dépend pas de la température, pour ajuster le pH de la solution.

Cependant il faut utiliser HCl et NaOH dans des concentrations faibles car une solution d'eau salée absorbe dans l'UV. Si nous préparons une solution acide/base avec NaOH et HCl dans les mêmes quantités que celles ajoutées pour ajuster le pH de la solution de PGA à 4.7, nous avons alors les concentrations suivantes :

$$[Cl^-] = 66.5 \text{ mmol.L}^{-1}$$

$$[Na^+] = 20.6 \text{ mmol.L}^{-1}$$

Nous avons mesuré le spectre d'absorbance d'une telle solution dans l'UV (voir figure 6.18) et pouvons constater une forte absorbance en dessous de 200 nm. A 220 nm l'absorbance atteint 0.106, soit un coefficient d'absorption de 1.2 cm^{-1} . A cette même longueur d'onde, le coefficient d'absorption

du PGA est mesuré à 46 cm^{-1} . On voit donc que l'absorption de NaCl est négligeable à ces petites concentrations.

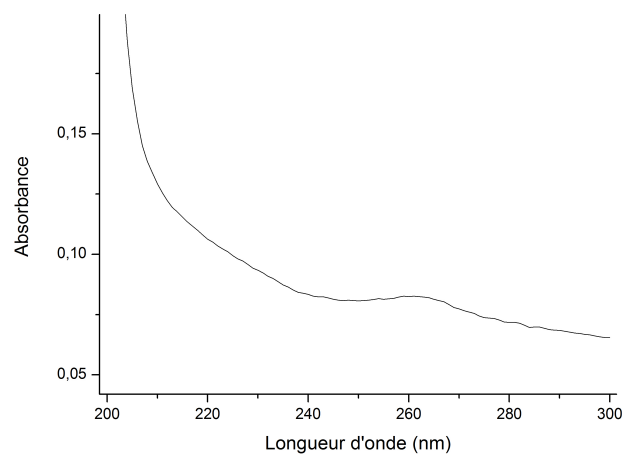


FIGURE 6.18 – Spectre d'une solution d'acide chlorhydrique et de chlorure de sodium préparée comme pour un échantillon de PGA. Longueur de cuve : 2mm

Annexe C : extraction de la bacteriorhodopsine

La bacteriorhodopsine s'obtient en effectuant une culture de la bactérie *Halobacterium Salinarium* dans des conditions favorisant le développement de la membrane pourpre c'est à dire en cas de manque d'oxygène.

Avec l'aide des biologistes du laboratoire j'ai effectué la culture et l'extraction de la bacteriorhodopsine en suivant le protocole de [75] et celui donné par Anne Colonna dans sa thèse [61].

Culture de la bactérie

Comme son nom l'indique, *Halobacterium Salinarium* est une bactérie des milieux très salins. Avant d'effectuer la culture en tant que telle, on effectue une petite préculture dans un volume restreint pour vérifier que la bactérie se développe bien.

Ensuite j'ai préparé un litre de milieu de culture avec les quantités suivantes :

NaCl	250 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	20 g
Citrate de trisodium 2H ₂ O	3 g
KCl	2 g
Peptone Oxoid L37 ¹	10 g

La culture est effectuée sous illumination constante dans un incubateur entre 37 et 40°C pendant 20 jours : il faut atteindre la phase stationnaire de la croissance pendant laquelle l'oxygène a été consommé et la bactérie développe la bactériorhodopsine.

Extraction de la membrane pourpre

Le milieu est d'abord centrifugé à 10000 G pendant 15 minutes. On enlève le surnageant et on dissout dans un premier tampon (125 mL par litre de culture) identique au milieu de culture mais sans la peptone avec ajout de 10 mg/L de DNase.

Cette suspension est mise à dialyser contre le second tampon contenant uniquement 6 g/L de NaCl. La différence de pression osmotique va provoquer l'éclatement des bactéries.

La suspension dialysée est centrifugée, plusieurs fois jusqu'à ce que le surnageant soit incolore, 40 minutes à 38000 G et 4°C. Entre chaque centrifugation les culots sont resuspendus dans le second tampon.

Les membranes sont rincées plusieurs fois à l'eau désionisée (suspensions puis centrifugations successives) puis suspendues dans un petit volume d'eau.

Pour séparer les types de membrane on effectue une migration sur gradient de sucrose. Des tubes d'une solution de sucrose contenant un gradient de 30 % à 50 % de concentration avec un coussin à 60

1. La peptone sert à nourrir les bactéries : il s'agit de protéines à moitié digérées par des réactions enzymatiques

% sont préparés à l'aide de l'appareil à FPLC(Fast protein liquid chromatography). La suspension de membrane est déposée en haut de chaque tube sur environ 1cm de hauteur. Les tubes sont centrifugés pendant 17h à 100000 G.

Lors de cette extraction je n'ai obtenu qu'une bande violette, et aucune bande rouge comme on s'y attend. Je suppose que c'est dû à la très longue durée de la culture : toute la membrane s'est convertie en membrane pourpre. On extrait la bande violette avec une seringue puis on rince avec de l'eau distillée (dissolution puis centrifugation à 23000 RPM deux fois)

J'ai obtenu environ 2 mL de solution de bacteriorhodopsine. Le spectre d'absorbance de cette solution dans une cuve de longueur 1 mm est présenté figure 6.19. Il est identique au spectre de la membrane pourpre donné dans l'article [75].

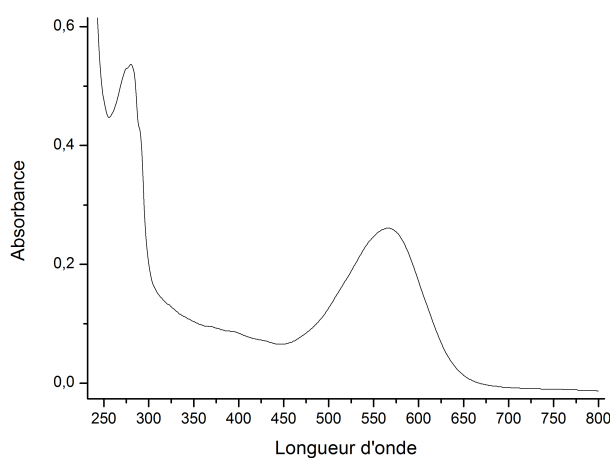


FIGURE 6.19 – Spectre d'absorbance de la solution de bacteriorhodopsine obtenue par la culture effectuée au laboratoire

Bibliographie

- [1] J. Yon-Kahn. *Histoire de la science des protéines*. 2006.
- [2] J. R. Lakowicz and G. Weber. Quenching of protein fluorescence by oxygen. Detection of structural fluctuations in proteins on the nanosecond time scale. *Biochemistry*, 12(21) :4171–9, October 1973.
- [3] E. Chen, M. J. Wood, A. L. Fink, and D. S. Kliger. Time-resolved circular dichroism studies of protein folding intermediates of cytochrome c. *Biochemistry*, 37 :5589–5598, 1998.
- [4] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular biology of the cell*. 2002.
- [5] Christian B. Anfinsen. Studies on the principles that govern the folding of protein chains, 1972.
- [6] K. A. Dill and H. S. Chan. From Levinthal to pathways to funnels. *Nature Structural Biology*, 4(1) :10–19, 1997.
- [7] A. Rodger and B. Nordén. *Circular dichroism and linear dichroism*. 1997.
- [8] J. Ph. Pérez. *Optique géométrique, ondulatoire et polarisation*. 1991.
- [9] S. M. Kelly, T. J. Jess, and N. C. Price. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et biophysica acta*, 1751(2) :119–39, August 2005.
- [10] M. Volk. Fast initiation of peptide and protein folding process. *Eur. J. Org. Chem.*, pages 2605–2621, 2001.
- [11] O. Bieri and T. Kiefhaber. Elementary steps in protein folding. *Biol. Chem.*, 380 :923–929, 1999.
- [12] R. H. Callender, R. B. Dyer, R. Gilmanishin, and W. H. Woodruff. Fast events in protein folding : the time evolution of primary processes. *Annual review of physical chemistry*, 49 :173–202, January 1998.
- [13] G. Bruhat. *Cours de physique générale, Optique*. 1992.
- [14] T. Dartigalongue and F. Hache. Precise alignment of a longitudinal Pockels cell for time-resolved circular dichroism experiments. *Journal of the Optical Society of America B*, 20(8) :1780, 2003.
- [15] C. Niezborala. *Une nouvelle technique de mesure du dichroïsme circulaire : premiers pas vers l'étude du repliement de polypeptides modèles*. PhD thesis, 2008.
- [16] Thibault Dartigalongue. *Dynamique conformationnelle de la myoglobine suivie par dichroïsme circulaire résolu temporellement*. PhD thesis, 2005.
- [17] C. Niezborala and F. Hache. Measuring the dynamics of circular dichroism in a pump-probe experiment with a Babinet-Soleil compensator. *Journal of the Optical Society of America B*, 23(11) :2418–2424, 2006.
- [18] S. A. Petty and M. Volk. Fast folding dynamics of an alpha-helical peptide with bulky side chains. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6(5) :1022–1030, 2004.
- [19] C. M. Phillips, Y. Mizutani, and R. M. Hochstrasser. Ultrafast thermally induced unfolding of RNase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 :7292–7296, 1995.
- [20] C. Delsart. *Lasers et optique non linéaire*. 2008.

- [21] M. Bertin, J. P. Faroux, and J. Renault. *Thermodynamique*. 1989.
- [22] W.O. Wray, T. Aida, and R.B. Dyer. Photoacoustic cavitation and heat transfer effects in the laser-induced temperature jump in water. *Applied Physics B : Lasers and Optics*, 74(1) :57–66, January 2002.
- [23] David R. Lide. *Handbook of chemistry and physics 90th edition*. 2010.
- [24] C. A. Rohl and R. L. Baldwin. Comparison of NH Exchange and Circular Dichroism as Techniques for Measuring the Parameters of the Helix-Coil Transition in Peptides. *Biochemistry*, 36 :8435–8442, 1997.
- [25] A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson, and R. G. Bates. Use of the glass electrode in deuterium oxide and the relation between the standardized pD (paD) scale and the operational pH in heavy water. *Anal. Chem.*, 40 :700–706, 1968.
- [26] C. Krejtschi and K. Hauser. Stability and folding dynamics of polyglutamic acid. *European biophysics journal : EBJ*, 40(5) :673–685, May 2011.
- [27] I. H. M. van Stokkum, H. Linsdell, J. M. Hadden, P. I. Haris, D. Chapman, and M. Bloemen-dal. Temperature-induced changes in protein structures studied by Fourier transform infrared spectroscopy and global analysis. *Biochemistry*, 34(33) :10508–10518, August 1995.
- [28] S. Yadav and F. Ahmad. A new method for the determination of stability parameters of proteins from their heat-induced denaturation curves. *Analytical biochemistry*, 283(2) :207–213, August 2000.
- [29] S. Sharma. *Helix-coil transition dynamics of alpha-helical peptides*. PhD thesis, 2006.
- [30] E. A. Gooding, S. Sharma, S. A. Petty, E. A. Fouts, C. J. Palmer, B. E. Nolan, and M. Volk. pH-dependent helix folding dynamics of poly-glutamic acid. *Chemical Physics*, November 2012.
- [31] R. A. Robinson, M. Paabo, and R. G. Bates. Deuterium Isotope Effect on the Dissociation of Weak Acids in Water and Deuterium Oxide. *Journal of research of the National Bureau of standards - A*, 73(3) :299–308, 1969.
- [32] Linus Pauling. *The nature of the chemical bond, third edition*. 1960.
- [33] A. Soper and C. Benmore. Quantum Differences between Heavy and Light Water. *Physical Review Letters*, 101(6), August 2008.
- [34] A. Zeidler, P. S. Salmon, H. E. Fischer, J. C. Neufeind, J. M. Simonson, H. Lemmel, H. Rauch, and Th. E. Markland. Oxygen as a Site Specific Probe of the Structure of Water and Oxide Materials. *Physical Review Letters*, 107(14), September 2011.
- [35] S. Scheiner and C. Martin. Relative Stability of Hydrogen and Deuterium Bonds. *J. Am. Chem. Soc.*, 118 :1511–1521, 1996.
- [36] C. B. Stanley and H. H. Strey. Osmotically induced helix-coil transition in poly(glutamic acid). *Biophysical journal*, 94(11) :4427–4434, June 2008.
- [37] T. Kimura, S. Takahashi, S. Akiyama, T. Uzawa, K. Ishimori, and I. Morishima. Direct observation of the multistep helix formation of poly-L-glutamic acids. *Journal of the American Chemical Society*, 124(39) :11596–11597, October 2002.
- [38] D. T. Clarke, A. J. Doig, B. J. Stapley, and G. R. Jones. The alpha-helix folds on the millisecond time scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(13) :7232–7237, June 1999.
- [39] Takayuki Sano and Tatsuya Yasunaga. Kinetics of helix-coil transition of polypeptides in solution by the relaxation methods. *Biophysical Chemistry*, 11(3-4) :377–386, 1980.
- [40] A. Pozo Ramajo, S. A. Petty, and M. Volk. Fast folding dynamics of alpha-helical peptides - Effect of solvent additives and pH. *Chemical Physics*, 323(1) :11–20, March 2006.
- [41] D. Klimov and D. Thirumalai. Viscosity Dependence of the Folding Rates of Proteins. *Physical Review Letters*, 79(2) :317–320, July 1997.

- [42] R. Fernandez-Prini, A. H. Harvey, and D. A. Palmer. *Aqueous systems at elevated temperatures and pressures*. 2004.
- [43] Manfred Holz, Xi-an Mao, Dieter Seiferling, and Antonio Sacco. Experimental study of dynamic isotope effects in molecular liquids : Detection of translation-rotation coupling. *The Journal of Chemical Physics*, 104(2) :669, 1996.
- [44] T. E. Meyer, J. A. Kyndt, S. Memmi, T. Moser, B. Colon-Acevedo, B. Devreese, and J. J. Van Beeumen. The growing family of photoactive yellow proteins and their presumed functional roles. *Photochemical and photobiological science*, (11) :1495–1514, 2012.
- [45] M. A. Cusanovich and T. E. Meyer. Photoactive yellow protein : a prototypic PAS Domain sensory protein and development of a common signaling mechanism. *Biochemistry*, 42(17), 2003.
- [46] K. J. Hellingwerf, J. Hendriks, and T. Gensch. Photoactive yellow protein, a new type of photoreceptor protein : will this yellow lab bring us where we want to go ? *Journal of physical chemistry A*, pages 1082–1094, 2003.
- [47] L. J. G. W. van Wilderen, M. A. van der Horst, I. H. M. van Stokkum, K. J. Hellingwerf, R. van Grondelle, and M. L. Groot. Ultrafast infrared spectroscopy reveals a key step for successful entry into the photocycle for photoactive yellow protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41) :15050–5, October 2006.
- [48] P. Changuenet-Barret, A. Espagne, P. Plaza, K. J. Hellingwerf, and M. M. Martin. Investigations of the primary events in a bacterial photoreceptor for photomotility : photoactive yellow protein (PYP). *New J. Chem.*, 29(4) :527–534, 2005.
- [49] Y. Imamoto, M. Harigai, T. Morimoto, and M. Kataoka. Low-temperature Spectroscopy of Met100Ala Mutant of Photoactive Yellow Protein. *Photochemistry and Photobiology*, 84 :970–976, 2008.
- [50] P. Changuenet-Barret, P. Plaza, M. M. Martin, H. Chosrowjan, S. Taniguchi, N. Mataga, Y. Imamoto, and M. Kataoka. Role of arginine 52 on the primary photoinduced events in the PYP photocycle. *Chemical Physics Letters*, 434(4-6) :320–325, February 2007.
- [51] D. S. Larsen, I. H. M. van Stokkum, M. Vengris, M. A. van Der Horst, F. L. de Weerd, K. J. Hellingwerf, and R. van Grondelle. Incoherent manipulation of the photoactive yellow protein photocycle with dispersed pump-dump-probe spectroscopy. *Biophysical journal*, 87(3) :1858–1872, September 2004.
- [52] B. Borucki, H. Otto, T. E. Meyer, M. A. Cusanovich, and M. P. Heyn. Sensitive circular dichroism marker for the chromophore environment of photoactive yellow protein : assignment of the 307 and 318 nm bands to the $n \rightarrow \pi^*$ transition of the carbonyl. *The journal of physical chemistry. B*, 109(1) :629–33, January 2005.
- [53] P. Changuenet-Barret, P. Plaza, M. M. Martin, H. Chosrowjan, S. Taniguchi, N. Mataga, Y. Imamoto, and M. Kataoka. Structural Effects on the Ultrafast Photoisomerization of Photoactive Yellow Protein. Transient Absorption Spectroscopy of Two Point Mutants. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113 :11605–11613, 2009.
- [54] D. A. Lightner and J. E. Gurst. *Organic conformational analysis and stereochemistry from circular dichroism spectroscopy*. 2000.
- [55] G. Groenhof, M. Buxin-Cademartory, B. Hess, S. P. De Visser, H. J. C. Berendsen, M. Olivucci, A. E. Mark, and M. A. Robb. Photoactivation of the photoactive yellow protein : why photon absorption triggers a trans-to-cis Isomerization of the chromophore in the protein. *Journal of the American Chemical Society*, 126(13) :4228–4233, April 2004.
- [56] F. Schotte, H. S. Cho, V. R. I. Kaila, H. Kamikubo, N. Dashdorj, E. R. Henry, T. J. Graber, R. Henning, M. Wulff, G. Hummer, M. Kataoka, and P. A. Anfinrud. Watching a signaling protein function in real time via 100-ps time-resolved Laue crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(47) :19256–19261, November 2012.

- [57] C. P. Joshi, B. Borucki, H. Otto, T. E. Meyer, M. A. Cusanovich, and M. P. Heyn. Photoreversal kinetics of the I1 and I2 intermediates in the photocycle of photoactive yellow protein by double flash experiments with variable time delay. *Biochemistry*, 44(2) :656–665, January 2005.
- [58] K. Bryl. Visual and archael rhodopsins : similarities, differences and controversy. *cellular and molecular biology letters*, 8(January) :285–296, 2003.
- [59] I. Provencio, I. R. Rodriguez, and G. Jiang. A novel human opsin in the inner retina. *The journal of Neuroscience*, 15 :600–605, 2000.
- [60] S. Nuttall, C. Bath, M. Pfeiffer, F. Santos, J. Eichler, and T. Mcalpine. *The Halohandbook*. Number March. 2008.
- [61] A. Colonna. *Polarisation ultrarapide et mouvements vibrationnels dans la bactériorhodopsine étudiés par spectroscopie cohérente d’émission infrarouge*. PhD thesis, 2005.
- [62] W. Kuhlbrandt. Bacteriorhodopsin - the movie. *Nature*, 406, 2000.
- [63] R. Herderson and P. N. T. Unwin. Three-dimentional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, 257 :28–32, 1975.
- [64] R. Neutze, E. Pebay-Peyroula, K. Edman, A. Royant, J. Navarro, and E. M. Landau. Bacteriorhodopsin : a high-resolution structural view of vectorial proton transport. *Biochimica et biophysica acta*, 1565(2) :144–167, October 2002.
- [65] J.W. Petrich, J. Breton, J.L. Martin, and A. Antonetti. Femtosecond absorption spectroscopy of light-adapted and dark-adapted bacteriorhodopsin. *Chemical Physics Letters*, 137(4) :369–375, 1987.
- [66] S. P. Balashov. Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin. *Biochimica et biophysica acta*, 1460(1) :75–94, August 2000.
- [67] S. P. Balashov, R. Govindjee, M. Kono, and E. Lukashov. Arg82ala mutant of bacteriorhodopsin expressed in *H. halobium* : drastic decrease in the rate of proton release and effect on dark adaptation. In *Structures and functions of retinal proteins*, pages 111–114, 1992.
- [68] E. Nachliel, M. Gutman, J. Tittor, and D. Oesterhelt. Proton transfer dynamics on the surface of the late M state of bacteriorhodopsin. *Biophysical journal*, 83(1) :416–426, July 2002.
- [69] B. Hessling, J. Herbst, R. Rammelsberg, and K. Gerwert. Fourier transform infrared double-flash experiments resolve bacteriorhodopsin’s M1 to M2 transition. *Biophysical journal*, 73(4) :2071–2080, October 1997.
- [70] H. Sass, G. Buldt, R. Gessenich, D. Hehn, D. Neff, R. Schlesinger, J. Berendzen, and P. Ormos. Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin. *Nature*, 406 :649–653, 2000.
- [71] H. Okazaki, C.-W. Chang, T. Akaike, O. Oshida, and T. Yasukawa. Biological significance of the trans-cis isomerization of retinal in proton transfer processes of bacteriorhodopsin. In *Structures and functions of retinal proteins*, pages 123–126, 1992.
- [72] S. Subramaniam, M. Lindahl, P. Bullough, a R. Faruqi, J. Tittor, D. Oesterhelt, L. Brown, J. Lanyi, and R. Henderson. Protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle. *Journal of molecular biology*, 287(1) :145–161, March 1999.
- [73] S. Subramaniam and R. Henderson. Crystallographic analysis of protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochimica et biophysica acta*, 1460(1) :157–65, August 2000.
- [74] J. Czéagéa and L. Reinisch. Photodestruction of bacteriorhodopsin. *Photochemistry and Photobiology*, 53(5) :659–666, May 1991.
- [75] D. Oesterhelt and W. Stoeckenius. Isolation of the cell membrane of halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrane. *Methods in enzymology*, 31 :667–678, 1974.

Résumé

Les protéines sont parmi les molécules les plus importantes du monde vivant. Ce sont en quelque sorte les abeilles ouvrières de tout organisme. Elles remplissent, entre autres, des fonctions enzymatiques, nerveuses, motrices ; elles transportent les petites molécules qui permettent aux cellules de fonctionner et de s'alimenter.

Au cours de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés à l'étude de différents aspects des changements conformationnels pouvant avoir lieu dans les protéines. Tous ces phénomènes ont été approchés par une méthode commune : la mesure du dichroïsme circulaire résolu en temps. En effet le dichroïsme circulaire peut donner des informations quantitatives sur la position d'un chromophore ou le repliement d'une hélice α ce qui est un grand avantage par rapport à d'autres mesures.

Ainsi nous avons étudié l'influence du solvant sur le dépliement de l'acide polyglutamique et observé des différences dynamiques et thermodynamiques entre les polypeptides dissouts dans l'eau et ceux placés dans l'eau lourde.

Nous avons, par une méthode différente, élucidé une étape clef de la relaxation du chromophore dans la protéine PYP.

Enfin nous avons abordé le mouvement des hélices α dans la bactériorhodopsine et ouvert la porte à la possibilité de changements conformationnels non prédits par d'autres mesures.

Grâce à différentes méthodes de mesure du dichroïsme circulaire nous avons pu étudier des phénomènes à des échelles de temps variant de la picoseconde à la microseconde. Nous espérons que ces méthodes pourront être étendues à l'étude d'autres mécanismes de repliement.

Abstract

Proteins are the most important macromolecules in the living world. They are in a way the working bees of all the living organisms. They perform many functions such as enzymatic, nervous, motion functions ; they can transport smaller molecules that allow the cells to feed and function.

During this three years of Thesis, we got interested in different aspects of the conformational changes that can happen in proteins. All these phenomena have been studied by a common method : the measurement of time resolved circular dichroism. What is interesting is that circular dichroism can give quantitative informations on a chromophore position or on the folding of an α -helix which is a big advantage over many other methods.

First, we studied the influence of the solvent on the poly(glutamic acid) folding and observed differences in the dynamics and thermodynamics of the phenomenon depending whether the peptide was dissolved in water or in heavy water.

We then studied, by a different method, a key step of the PYP's chromophore relaxation.

Finally we tried to approach the movement of α -helices in bacteriorhodopsin and opened the question about conformational changes that have not been predicted or observed yet.

Thanks to different measurement methods, we have been able to study phenomena on timescales from picoseconds to microseconds. We hope that these methods will be extended to the study of many other folding mechanisms.